



## **II MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Universidade Nova de Lisboa



# **CONTRIBUIÇÃO PARA O DIAGNÓSTICO MOLECULAR DAS ONICOMICOSSES**

**Sandra Cristina Marinheiro Ferreira Copeto**

**2010**



## **II MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Universidade Nova de Lisboa



# **CONTRIBUIÇÃO PARA O DIAGNÓSTICO MOLECULAR DAS ONICOMICOSSES**

**Sandra Cristina Marinheiro Ferreira Copeto**

*Tese apresentada para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas*

*Orientadora: Investigadora Doutora Maria da Luz Martins*

*Co-Orientador: Investigador Doutor João Inácio Silva*

**2010**

## **AGRADECIMENTOS**

Aos homens da minha vida, João e Rafael Copeto.

A minha orientadora, Inv. Doutora Maria da Luz Martins.

A minha colega, Dr.<sup>a</sup> Ana Paula Maduro.

Aos meus Pais e Irmão.

**Sem os quais esta tarefa teria sido impossível.....**

# Índice de Matérias

<b>Lista de abreviaturas .....</b>	<b>8</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>9</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>13</b>
1.1. As Infecções Fúngicas Superficiais .....	15
1.2. As Onicomicoses .....	18
1.3. Os agentes etiológicos das Onicomicoses.....	23
1.3.1 Fungos Dermatófitos .....	24
1.3.2. Fungos Filamentosos não Dermatófitos .....	30
1.3.3. Leveduras.....	32
1.4. Diagnóstico Laboratorial das Onicomicoses .....	34
1.4.1. Colheita e Processamento do Material Clínico .....	34
1.4.2. Microscopia Directa .....	35
1.4.3. Diagnóstico Cultural.....	37
1.4.4. Métodos Moleculares de Diagnóstico .....	40
1.5. Objectivos do Trabalho realizado e Plano da Dissertação .....	43
<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>46</b>
2.1. Origem das Amostras Clínicas.....	47
2.2. Colheita e Transporte do Material Clínico .....	47
2.3. Diagnóstico Convencional das Infecções .....	49
2.3.1. Processamento Laboratorial das Amostras .....	49
2.3.2. Exame Directo das Amostras .....	49
2.3.3. Isolamento e Identificação dos Fungos em Cultura .....	50
2.4. Extracção Directa de DNA Fúngico a Partir de Unhas Com Infecção .....	51



2.5. Diagnóstico Molecular de Onicomicoses .....	55
2.5.1. Quantificação do DNA extraído .....	57
2.5.2. Amplificação da Região ITS do rDNA por PCR .....	58
2.5.3. Reacção de PCR .....	58
2.5.4. Visualização dos produtos de amplificação .....	59
2.5.5. Purificação do DNA .....	60
2.5.6. Sequenciação .....	61
<b>RESULTADOS e DISCUSSÃO .....</b>	<b>62</b>
3.1. As Amostras Clínicas de Onicomicoses .....	63
3.2. Diagnóstico Convencional das Infecções .....	64
3.2.1. Exame Directo das Amostras .....	64
3.2.2. Isolamento e Identificação dos Fungos em Cultura .....	66
3.3. Identificação Molecular dos Fungos causadores de Onicomicose.....	75
3.3.1. Extracção directa de DNA Fúngico a Partir de Unhas Infectadas.....	75
3.3.2. Amplificação da Região ITS do rDNA por PCR .....	75
3.3.3. Sequenciação da região ITS e identificação dos fungos infectantes .....	78
<b>CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>88</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>95</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>104</b>
Anexo 1 .....	104
Anexo 2 .....	105
Anexo 3 .....	108
Anexo 4 .....	113

## Índice de Figuras

FIGURA 1 - LOCALIZAÇÃO DAS DIFERENTES POSSÍVEIS PORTAS DE ENTRADA DOS AGENTES ETIOLÓGICOS DAS ONICOMICOSSES (ROSSANA SETTE 2006). .....	19
FIGURA 2 - ONICOMICOSE SUBUNGUEAL DISTAL E LATERAL (ROSSANA SETTE 2006). .....	20
FIGURA 3 - ONICOMICOSE SUPERFICIAL LEITOSA (ROSSANA SETTE 2006). .....	21
FIGURA 4 - ONICOMICOSE SUBUNGUEAL PROXIMAL (ROSSANA SETTE 2006). .....	22
FIGURA 5 - ONICOMICOSE DISTRÓFICA TOTAL (ROSSANA SETTE 2006). .....	22
FIGURA 6 - ONÍQUIA (ROSSANA SETTE 2006). .....	23
FIGURA 7 - EXEMPLO DE EXAME DIRECTO EM KOH, ONDE SE PODEM OBSERVAR CLARAMENTE HIFAS DE UM FUNGO FILAMENTOSO. ....	36
FIGURA 8 - TÉCNICAS UTILIZADAS EM ESTUDOS DE TAXONOMIA POLIFÁSICA .....	42
FIGURA 9 - QUICKGENE MINI80® DA FUJIFILM. ....	52
FIGURA 10 - ESQUEMA DA EXTRACÇÃO FINAL DO DNA DAS AMOSTRAS PELO MÉTODO QUICKGENE® DA FUJIFILM. ....	54
FIGURA 11 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REGIÃO ITS DA UNIDADE DE DNA RIBOSSÓMICO. ABREVIATURAS: ITS1 E ITS2, ESPAÇADORES TRANSCRITOS (INTERNAL TRANSCRIBED SPACERS); ITS1 E ITS4, PRIMERS UNIVERSAIS PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS. ....	56
FIGURA 12 - APLICAÇÃO DA AMOSTRA NO NANODROP PARA QUANTIFICAÇÃO DO DNA EXISTENTE.....	58
FIGURA 13 - FRAGMENTO DO GRÁFICO RESULTANTE DA DETERMINAÇÃO DA SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA DA REGIÃO ITS DO RDNA DA AMOSTRA 19 EM QUE SE PODE OBSERVAR QUE PARA O MESMO NUCLEÓTIDO EXISTE FREQUENTEMENTE MAIS DO QUE UM PICO DO GRÁFICO SIGNIFICANDO UMA MISTURA DE DOIS OU MAIS DNAs DE ORGANISMOS DIFERENTES NA MESMA AMOSTRA. ....	82
FIGURA 14 - FRAGMENTO DO GRÁFICO RESULTANTE DA DETERMINAÇÃO DA SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA DA REGIÃO ITS DO RDNA DA AMOSTRA 24 EM QUE SE PODE OBSERVAR QUE PARA CADA NUCLEÓTIDO EXISTE UM ÚNICO PICO DO GRÁFICO QUE PERMITIU A IDENTIFICAÇÃO DE <i>C. PARAPSILOSIS</i> COM 94% DE CONFIANÇA. ....	84
FIGURA 15 - FRAGMENTO DO GRÁFICO RESULTANTE DA DETERMINAÇÃO DA SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA DA REGIÃO ITS DO RDNA DA AMOSTRA 26 EM QUE SE PODE OBSERVAR QUE PARA CADA NUCLEÓTIDO EXISTE UM ÚNICO PICO DO GRÁFICO QUE PERMITIU A IDENTIFICAÇÃO DE <i>C. PARAPSILOSIS</i> COM 97% DE CONFIANÇA. ....	84
FIGURA 16 - FRAGMENTO DO GRÁFICO RESULTANTE DA DETERMINAÇÃO DA SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA DA REGIÃO ITS DO RDNA DA AMOSTRA 20 EM QUE SE PODE OBSERVAR QUE PARA CADA NUCLEÓTIDO EXISTE UM ÚNICO PICO DO GRÁFICO QUE PERMITIU A IDENTIFICAÇÃO DE <i>C. ALBICANS</i> COM 99% DE CONFIANÇA. ....	85
FIGURA 17 - AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS DO RDNA DOS PRODUTOS DE EXTRACÇÃO DAS AMOSTRAS 1 A 12, OBTIDOS DIRECTAMENTE DAS UNHAS INFECTADAS ESTUDADAS NESTE TRABALHO. AS AMOSTRAS SÃO IDENTIFICADAS PELOS RESULTADOS OBTIDOS A PARTIR DAS CULTURAS DO DIAGNÓSTICO CONVENCIONAL. OS NÚMEROS A VERDE REFEREM-SE ÀS AMOSTRAS A PARTIR DAS QUAIS SE OBTVEU AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS. O AMARELO SÃO REPRESENTADOS OS RESULTADOS NEGATIVOS. ....	108
FIGURA 18 - AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS DO RDNA DOS PRODUTOS DE EXTRACÇÃO DAS AMOSTRAS 13 A 24, OBTIDOS DIRECTAMENTE DAS UNHAS INFECTADAS ESTUDADAS NESTE TRABALHO. AS AMOSTRAS SÃO IDENTIFICADAS PELOS RESULTADOS OBTIDOS A PARTIR DAS CULTURAS DO DIAGNÓSTICO CONVENCIONAL. OS NÚMEROS A VERDE REFEREM-SE ÀS AMOSTRAS A PARTIR DAS QUAIS SE OBTVEU AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS. O AMARELO SÃO REPRESENTADOS OS RESULTADOS NEGATIVOS. ....	109
FIGURA 19 - AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS DO RDNA DOS PRODUTOS DE EXTRACÇÃO DAS AMOSTRAS 25 A 36, OBTIDOS DIRECTAMENTE DAS UNHAS INFECTADAS ESTUDADAS NESTE TRABALHO. AS AMOSTRAS SÃO IDENTIFICADAS PELOS RESULTADOS OBTIDOS A PARTIR DAS CULTURAS DO DIAGNÓSTICO CONVENCIONAL. OS NÚMEROS A VERDE REFEREM-SE ÀS AMOSTRAS A PARTIR DAS QUAIS SE OBTVEU AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS. O AMARELO SÃO REPRESENTADOS OS RESULTADOS NEGATIVOS. ....	110

FIGURA 20 - AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS DO RDNA DOS PRODUTOS DE EXTRACÇÃO DAS AMOSTRAS 37 A 48, OBTIDOS DIRECTAMENTE DAS UNHAS INFECTADAS ESTUDADAS NESTE TRABALHO. AS AMOSTRAS ESTÃO IDENTIFICADAS PELOS RESULTADOS OBTIDOS A PARTIR DAS CULTURAS DO DIAGNÓSTICO CONVENCIONAL. OS NÚMEROS A VERDE REFEREM-SE ÀS AMOSTRAS A PARTIR DAS QUAIS SE OBTVE AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS. A AMARELO ESTÃO REPRESENTADOS OS RESULTADOS NEGATIVOS. ....	111
FIGURA 21 - AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS DO RDNA DOS PRODUTOS DE EXTRACÇÃO DAS AMOSTRAS 49 A 60, OBTIDOS DIRECTAMENTE DAS UNHAS INFECTADAS ESTUDADAS NESTE TRABALHO. AS AMOSTRAS ESTÃO IDENTIFICADAS PELOS RESULTADOS OBTIDOS A PARTIR DAS CULTURAS DO DIAGNÓSTICO CONVENCIONAL. OS NÚMEROS A VERDE REFEREM-SE ÀS AMOSTRAS A PARTIR DAS QUAIS SE OBTVE AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS. A AMARELO ESTÃO REPRESENTADOS OS RESULTADOS NEGATIVOS. ....	112
FIGURA 22 - FRAGMENTOS PURIFICADOS CORRESPONDENTES À REGIÃO ITS DO RDNA AMPLIFICADA POR PCR, RELATIVOS ÀS AMOSTRAS 10, 19, 20, 21, 24, 25, 26, 29, 30 E 31. AS AMOSTRAS ESTÃO IDENTIFICADAS PELOS RESULTADOS OBTIDOS A PARTIR DAS CULTURAS DO DIAGNÓSTICO CONVENCIONAL. OS NÚMEROS A VERDE REFEREM-SE ÀS AMOSTRAS A PARTIR DAS QUAIS SE OBTVE PRODUTO AMPLIFICADO DA REGIÃO ITS APÓS A PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR. A VERMELHO ESTÃO REPRESENTADOS OS RESULTADOS PARA OS QUAIS NÃO SE OBTVE FRAGMENTOS APÓS A PURIFICAÇÃO. ....	113
FIGURA 23 - FRAGMENTOS PURIFICADOS CORRESPONDENTES À REGIÃO ITS DO RDNA AMPLIFICADA POR PCR, RELATIVOS ÀS AMOSTRAS 3, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 14, 15, 29, 30 E 31. AS AMOSTRAS ESTÃO IDENTIFICADAS PELOS RESULTADOS OBTIDOS A PARTIR DAS CULTURAS DO DIAGNÓSTICO CONVENCIONAL. OS NÚMEROS A VERDE REFEREM-SE ÀS AMOSTRAS A PARTIR DAS QUAIS SE OBTVE PRODUTO AMPLIFICADO DA REGIÃO ITS APÓS A PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR. A VERMELHO ESTÃO REPRESENTADOS OS RESULTADOS PARA OS QUAIS NÃO SE OBTVE FRAGMENTOS APÓS A PURIFICAÇÃO. ....	114
FIGURA 24 – FRAGMENTOS PURIFICADOS CORRESPONDENTES À REGIÃO ITS DO RDNA AMPLIFICADA POR PCR, RELATIVOS ÀS AMOSTRAS 1, 2, 9, 16 E 18. AS AMOSTRAS ESTÃO IDENTIFICADAS PELOS RESULTADOS OBTIDOS A PARTIR DAS CULTURAS DO DIAGNÓSTICO CONVENCIONAL. OS NÚMEROS A VERDE REFEREM-SE ÀS AMOSTRAS A PARTIR DAS QUAIS SE OBTVE PRODUTO AMPLIFICADO DA REGIÃO ITS APÓS A PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR. A VERMELHO ESTÃO REPRESENTADOS OS RESULTADOS PARA OS QUAIS NÃO SE OBTVE FRAGMENTOS APÓS A PURIFICAÇÃO.....	115

## Índice de Tabelas

TABELA 1 - PRINCIPAIS CRITÉRIOS UTILIZADOS PARA A IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE FUNGOS PATOGENICOS FILAMENTOSOS (RIPPON 1988, CLAYTON & MIDGLEY 1989, LACAZ <i>ET AL</i> 1991).....	40
TABELA 2 - QUADRO RESUMO DA METODOLOGIA UTILIZADA NA RECOLHA DE AMOSTRAS CLÍNICAS DOS DIFERENTES TIPOS DE ONICOMICOSE .....	48
TABELA 3 - REAGENTES DA REACÇÃO DE PCR.....	59
TABELA 4 – RESULTADOS DA IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS ENVIADAS PARA SEQUENCIAÇÃO DA REGIÃO ITS .....	80
TABELA 5 - IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS ESTUDADAS .....	104
TABELA 6 - EXAME DIRECTO, EXAME CULTURAL & QUANTIFICAÇÃO COM NANODROP .....	105

## Índice de Gráficos

GRÁFICO 1 - DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS POR LOCALIZAÇÃO ANATÓMICA .....	64
GRÁFICO 2 - RESULTADOS DO EXAME DIRECTO E CULTURAL DAS AMOSTRAS COM SUSPEITA DE ONICOMICOSE.....	65
GRÁFICO 3 - ETIOLOGIA DAS ONICOMICOSSES COM BASE NOS RESULTADOS OBTIDOS NA CULTURA DAS AMOSTRAS ESTUDADAS NESTE TRABALHO.....	67
GRÁFICO 4 - - DISTRIBUIÇÃO DE TODOS OS AGENTES CAUSADORES DE ONICOMICOSE NAS AMOSTRAS.....	68
GRÁFICO 5 - FREQUÊNCIA DE ISOLAMENTO DE DERMATÓFITOS PARTIR DAS ONICOMICOSSES ESTUDADAS .....	69
GRÁFICO 6 - FREQUÊNCIA DE ISOLAMENTO DE <i>CANDIDA</i> SP. A PARTIR DAS ONICOMICOSSES ESTUDADAS .....	70
GRÁFICO 7 - FREQUÊNCIA DE ISOLAMENTO DE LEVEDURAS A PARTIR DAS ONICOMICOSSES ESTUDADAS .....	71
GRÁFICO 8 - FREQUÊNCIA DE ISOLAMENTO DE FUNGO FILAMENTOSO NÃO DERMATÓFITO PARTIR DAS ONICOMICOSSES ESTUDADAS .....	73

### Lista de abreviaturas

DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleótido-trifosfato
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
FND	Fungos Não Dermatófitos
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer Regions</i>
IHMT	Instituto Higiene e Medicina Tropical
KOH	Hidróxido de Potássio
NaCl	Cloreto de Sódio
Pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDA	Potato Dextrose Agar
rDNA	Ácido desoxirribonucleico ribossômico
RNA	Ácido Ribonucleico
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphisms</i>
SIDA	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
sp.	Espécie
TBE	Tampão Tris, Ácido Bórico e EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
UV	Luz Ultravioleta
VIH	Vírus da Imunodeficiência Humana

## Resumo

Onicomicose ou infecção fúngica das unhas das mãos ou dos pés pode ser provocada por fungos que invadem primariamente a lâmina ungueal saudável. Embora existam outros agentes, como por exemplo bactérias, que podem causar infecções ungueais, as infecções causadas por fungos são mais frequentes e são consideradas uma das principais onicopatias do homem. Os efeitos psicológicos e emocionais que resultam dos aspectos clínicos da onicomicose podem ser marcantes e ter um impacto significativo na qualidade de vida dos portadores. É uma doença com grande potencial crónico associada a uma séria dificuldade terapêutica, sendo estes os principais factores agravantes do seu prognóstico.

Conforme a extensão do comprometimento e a porção da unha envolvida na onicomicose, a infecção causada por fungos pode ser classificada em 5 tipos: onicomicose subungueal distal e lateral, onicomicose superficial leitosa, onicomicose subungueal proximal, onicomicose com distrofia total e onicomicose por candidose. São causadas por diferentes agentes etiológicos sendo que os mais comuns são os fungos dermatófitos (80 a 90%), seguidos pelas leveduras (5 a 17%) e fungos filamentosos não dermatófitos (2 a 12%).

Neste trabalho foram estudadas 54 amostras recolhidas de unhas de doentes com hipótese clínica de onicomicose, das quais 25,93% (14/54) pertenciam a indivíduos do sexo masculino e 74,07% (40/54) a indivíduos do sexo feminino. As técnicas convencionais de diagnóstico são morosas e muitas vezes de difícil caracterização a nível fenotípico, o que condiciona grandemente a implementação da terapêutica adequada.

O presente trabalho teve como principal objectivo a aquisição de conhecimentos que permitissem um correcto diagnóstico micológico das onicomicoses, através do isolamento e identificação das espécies de fungos causadoras de infecção.

De uma forma global, consistiu inicialmente no isolamento e posteriormente na identificação dos agentes etiológicos de onicomicoses, utilizando para tal metodologias convencionais e moleculares. Foi realizado o diagnóstico laboratorial baseado no exame directo e na cultura de fragmentos de unhas provenientes de doentes com infecção. Paralelamente, foi extraído o DNA fúngico das mesmas amostras clínicas que, após amplificação da região ITS dos genes ribossómicos foi utilizado para confirmação e comparação dos resultados. Foi igualmente estudada a ocorrência de fungos não dermatófitos responsáveis por onicomiose.

Os métodos moleculares de diagnóstico podem não só constituir uma alternativa mais rápida de diagnóstico micológico como também, por serem mais sensíveis, permitir a detecção de espécies que, por serem de crescimento fastidioso, não se desenvolvem em cultura.

## Abstract

Onychomycosis, or fungi infection on hands and feet's nails, are caused by fungus that primary invade the healthy nail blade. Although there are other factors such as bacteria's that can cause nail infections, the infections caused by fungi, are more frequent and can be considered one of the primary human onychopathies.

The psychological and emotional effects caused by the clinical aspects of these infections, can have a major impact in the quality of life of those infected. The prognosis to these diseases is always aggravated by its very difficult therapy and great chronic potential.

The infection can be classified in 5 different types, regarding the extension and percentage of fingernail affected: Distal and lateral subungueal onychomycosis; Endonyx onychomycosis or white superficial onychomycosis; Proximal subungueal onychomycosis; Total dystrophy onychomycosis or *Candida* Onychomycosis.

The infection is caused by several different etiological agents. In most cases, 80% to 90%, the infection is caused by dermatophytes fungi, but it can also be caused by yeasts, in 5% to 17% of the cases, or even by filamentous non-dermatophyte fungi, in 2% to 12% of the cases.

In this work were considered 54 samples, collected from unhealthy nails, with Onychomycosis clinical suspicion. Of these samples, 25.93% (14 out of 54) where obtained from masculine individuals and 70.07% (40 out of 54) where obtained from feminine individuals.

Conventional diagnostic techniques are time consuming and of difficult phenotypic level characterization. Because of these, the correct therapeutic to be implemented is often difficult to achieve.



The main objective of this work was to explore and compile existing knowledge, in order to obtain a correct mycological onychomycosis diagnosis, through the correct isolation and identification of the different species of fungi that can cause these infections.

Holistically, onychomycosis etiological agents were isolated and identified, through the use of conventional and molecular methodologies. Laboratorial diagnosis was preformed based in direct sample analysis and fragment nail culture, using samples from the infected individuals.

Fungi DNA were extracted from the same clinical samples. Ribosomal genes ITS region amplification was preformed to compare and confirm the results. The presence of non-dermatophyte fungi, responsible for Onychomycosis was also considered.

## **INTRODUÇÃO GERAL**

Os fungos habitam o planeta Terra há pelo menos 300 milhões de anos, sendo representantes bem sucedidos na cadeia evolutiva dos seres vivos. São seres eucariotas heterotróficos, que possuem ampla distribuição na natureza, podendo ser encontrados em vários habitats, tais como ar, água, terra, animais e alimentos.

Das mais de 200 000 espécies descritas, cerca de 200 foram reconhecidas como patogênicas específicas ou primárias, causando desde quadros cutâneos superficiais até infecções sistêmicas potencialmente fatais (Schell 1995, Lacaz *et al.* 2002). No entanto somente 100 destas espécies são capazes de causar doença em indivíduos aparentemente saudáveis. As restantes só têm capacidade de causar doença em hospedeiros que se encontram debilitados ou imunocomprometidos.

As espécies de fungos sofrem variações conforme a localidade, estação do ano, humidade do ar, entre outras (Lacaz *et al.* 1991, Sidrim & Moreira 1999, Trabulsi *et al.* 1999). Tais fungos são encontrados frequentemente como componentes transitórios da biosfera do homem e animais domésticos agindo como contaminantes de alimentos, madeiras, tanto em água doce como em água salgada, sendo considerados como responsáveis pela contaminação de diversos materiais (Trabulsi *et al.* 1999). Por oportunismo, a partir da dispersão dos seus esporos através do vento ou por inoculação traumática, os fungos acabam por provocar patologias no ser humano (Jawets 1998).

A classificação taxonómica dos fungos é baseada geralmente em estruturas relacionadas com a reprodução sexuada e, na falta desta, a mesma é feita pelos órgãos de reprodução assexuada (Richardson & Warnock 1993, Sidrim & Moreira 1999).

Os fungos podem ser unicelulares no caso das leveduras, ou multicelulares no caso dos fungos filamentosos. Abrangem diversas espécies e géneros que, morfológicamente e fisiologicamente, têm aspecto estrutural celular, com núcleo envolvido por membrana nuclear, o que os caracteriza como eucariotas. As suas células possuem retículo endoplasmático, mitocôndrias, vacúolos, microtúbulos e ribossomas e uma parede celular quitinosa. Na organização da membrana plasmática dos fungos podemos encontrar ergosterol, assim como lípidos e proteínas (Mendes-Giannini & Melhem 1996). As micoses são doenças causadas pelo desenvolvimento de diversas espécies de fungos tanto na pele, cabelo e unhas, como em qualquer outro órgão.

### **1.1. As Infecções Fúngicas Superficiais**

De acordo com os tecidos e órgãos atingidos, as micoses são classificadas em micoses superficiais e cutâneas, como as dermatofitoses, que atingem a superfície cutânea, os pêlos, as unhas ou as mucosas, mais limitadas ou mais extensas consoante o estado das defesas do hospedeiro, as micoses subcutâneas que atingem os tecidos subcutâneos e por vezes os ossos, e as micoses sistêmicas ou profundas que atingem principalmente órgãos internos e vísceras, podendo afectar múltiplos tecidos ou órgãos (Trabulsi *et al.* 1999).

As micoses superficiais incluem as infecções causadas por fungos, limitadas às camadas queratinizadas ou semiqueratinizadas da pele (Sampaio *et al.* 1985). Quando estes fungos encontram condições favoráveis ao seu crescimento, como calor, humidade, diminuição do estado imunitário do hospedeiro ou uso de antibióticos sistémicos por longo prazo, reproduzem-se invadindo os tecidos e passam então a causar doença.

As micoses superficiais com maior gravidade desenvolvem-se em indivíduos submetidos a terapêuticas agressivas durante longos prazos, alterando o equilíbrio entre fungos e bactérias ou em indivíduos sob terapêutica corticosteróide ou imunossupressora, por exemplo.

Doenças como diabetes, VIH e depressão, facilitam a ocorrência das micoses superficiais, assim como em indivíduos submetidos a situações de stress continuado.

Tal facto deve-se às repercussões metabólicas ocorridas no sistema imunológico nestas situações adaptativas. Com a excepção das infecções das unhas, as dermatofitoses são simples de controlar quando correctamente tratadas.

A apresentação clínica depende de vários factores que incluem o local de infecção, a resposta imunológica do hospedeiro e a espécie de fungo infectante. Na grande maioria das formas de dermatofitose, os fungos estão confinados ao trato superficial da pele, cabelos e unhas. No entanto formas de infecção que envolvem tecidos mais profundos podem ocorrer, resultando na formação de lesões supurativas.

As infecções superficiais causadas por fungos dermatófitos são chamadas clinicamente de *Tineas*, seguidas do nome do local anatómico afectado:

A *Tinea pedis* ou pé-de-atleta localiza-se nos espaços interdigitais dos pés. Na forma aguda é pruriginosa vesicular e avermelhada e na forma crónica ocorrem fissuras e descamação.

Na *Tinea manum* ou tinha das mãos a região palmar com aspecto descamativo, pulverulento, mais seco que em outras localizações (Lacaz 1998).

Na *Tinea ungueum*, onicomicose ou tinha das unhas, estas tornam-se espessadas, quebradiças, despigmentadas e sem brilho. Quando há enegrecimento da placa ungueal é sugestivo de simbiose bacteriana, com frequência por *Pseudomonas* sp. (Lacaz 1998).

Na *Tinea corporis* ou tinha da pele glabra as lesões tomam o aspecto de herpes circinado ou *ringworm* no tronco, pescoço e face. Posteriormente as lesões tornam-se exsudativas na periferia,

evoluindo para o centro da lesão e, os pêlos caem. A transmissão é claramente um importante factor disseminador da doença e faz-se através do contacto com pessoas ou animais doentes e objectos contaminados (Lacaz 1998).

A *Tinea cruris* ou tinha das virilhas e glútea em geral, está frequentemente associada à tinha dos pés e é mais frequente nos homens que nas mulheres. Resulta frequentemente de auto inoculações através de toalhas, da roupa ou das mãos, ao coçar. Inicia-se nas pregas que por terem um microclima quente e húmido, favorecem a disseminação do fungo para a pele circundante.

Na *Tinea barbae* ou tinha da zona da barba observam-se supurações foliculares e inflamação dos pêlos da barba com formação de pápulas e crostas (Lacaz 1998). Os fungos zoofílicos são uma causa frequente de infecção nesta localização.

A *Tinea capitis* ou tinha do couro cabeludo é uma infecção do couro cabeludo e dos cabelos por fungos queratinofílicos. Esta infecção ocorre quase exclusivamente em crianças de idade escolar e caracteriza-se por placas de alopecia ou tonsurantes que podem estar ou não associadas a processos inflamatórios (Kerion Celsi). Em geral os organismos responsáveis variam em função da região geográfica e provocam pequenas epidemias em escolas, creches e orfanatos, constituindo por isso um problema de saúde pública.

Existem igualmente micoses superficiais causadas por fungos não dermatófitos que incluem entre outros os habituais saprófitas de vida livre na natureza. Em seguida irão ser referidas as mais prováveis de serem observadas no nosso País, com excepção das que invadem exclusivamente as unhas, pois estas serão referidas mais à frente, com mais detalhe.

A pitíriase versicolor ou tinha versicolor é de todas as micoses superficiais, a mais frequente nas áreas não tropicais, atingindo cerca de 60% da população portuguesa. Tem como agente etiológico *Malassezia furfur* e é encontrado como saprófita da pele e no ar (poeira) (Gupta *et al.* 2000). Este fungo é encontrado em áreas do corpo ricas em glândulas sebáceas e o quadro clínico apresenta

lesões hipo ou hiperpigmentadas, localizadas principalmente na metade superior do tronco, pescoço e braços (Lacaz 1998).

As candidoses superficiais ou infecções provocadas pelas leveduras do género *Candida* são usualmente associadas a alterações patogénicas ao nível do epitélio, em particular nas membranas mucosas, após o comprometimento das barreiras naturais. As manifestações clínicas são muito variáveis dependendo dos órgãos envolvidos, e podem ter um carácter agudo, crónico ou episódico.

A sua localização é variada, podendo surgir em diferentes localizações, tais como mucosas da boca, garganta, vagina, uretra, pele e unhas. Existem também localizações mais profundas como brônquios, pulmões, tracto digestivo, órgãos internos e até sangue, dependendo do estado imunitário do doente.

As formas clínicas mais comuns são a candidose orofaríngea, a candidose vulvovaginal, a candidose cutânea ou intertrigo e as onicomicoses, que não só infectam as unhas como também a região peri-ungueal.

## **1.2. As Onicomicoses**

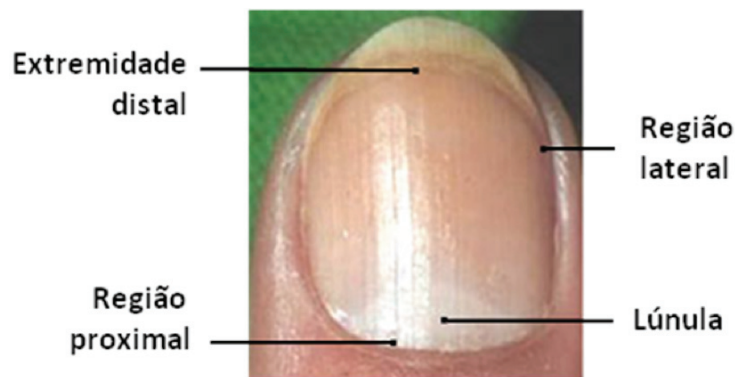
Onicomicose ou infecção fúngica das unhas das mãos ou dos pés é provocada por fungos que invadem primariamente a lâmina ungueal saudável. Embora existam outros agentes, tais como bactérias, as infecções causadas por fungos são mais frequentes e são consideradas uma das principais infecções das unhas no homem (Badillet *et al.* 1988, Haneke 1991).

Além de funcionar como porta de entrada para infecções disseminadas em indivíduos imunocomprometidos, a onicomicose pode afectar pessoas saudáveis causando dor, desconforto, limitações físicas e ocupacionais frequentemente sérias e limitadoras.

Os efeitos psicológicos e emocionais que resultam dos aspectos clínicos da onicomicose podem ser marcantes, tendo um impacto significativo na qualidade de vida dos portadores. É uma doença com grande potencial crónico associada a uma séria dificuldade terapêutica, sendo estes os principais factores agravantes do seu prognóstico (Perea *et al.* 2000).

As formas clínicas de onicomicose dependem da porta de entrada do fungo e do agente infectante e, apesar da melhoria geral na higiene pessoal das populações, é uma doença em expansão.

As unhas são lâminas queratinizadas que cobrem a última falange dos dedos. A unha é dividida em quatro partes (Figura 1), raiz (na região proximal), lâmina (aderente ao leito ungueal), sulcos laterais e bordo livre ou extremidade da unha (Sampaio 2001).



Existem diversas vias de penetração fúngica na unha, tais como a via proximal, a via de penetração lateral, a via distal, ou a invasão directa. Nas vias proximal e lateral a penetração é feita através do sulco periungueal, em regra associada a perioníquia, a qual por vezes, origina distrofia ungueal. Na via distal a penetração é feita através do sulco subungueal, como nas dermatofitoses.

Conforme a extensão do comprometimento e a porção da unha envolvida na onicomicose, a infecção causada por fungos pode ser classificada em 5 tipos: Onicomicose subungueal distal e lateral,

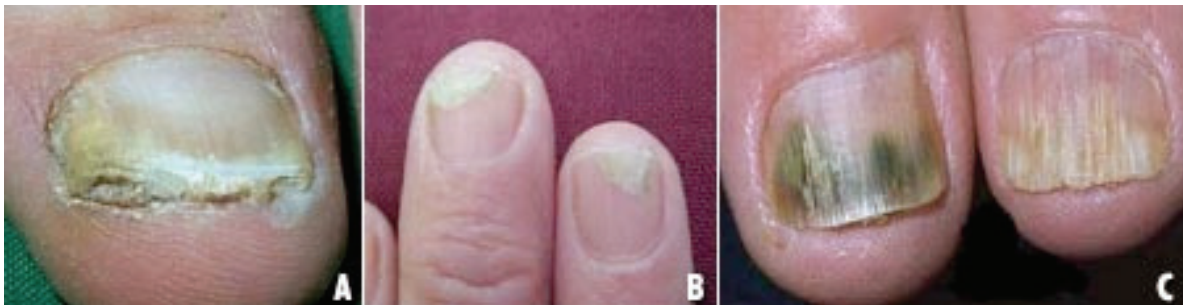


onicomicose superficial leitosa, onicomicose subungueal proximal, onicomicose com distrofia total e onicomicose por candidose (Gupta & Summerbell 1999).

### **Onicomicose subungueal distal e lateral**

É a forma mais comum de micose ungueal tanto das mãos como dos pés (Kaur *et al.* 2008). Inicia-se pelo descolamento do bordo livre da unha, que descola do seu leito (Figura 2). Geralmente começa pelos cantos e provoca onicólise (unha oca). Pode levar à acumulação de material subungueal.

É muito frequente nas infecções por dermatófitos (*Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. megninii*, *T. violaceum*, *T. tonsurans*) e por não dermatófitos, como no caso dos fungos dos géneros *Fusarium*, *Aspergillus*, *Cephalosporium* e leveduras do género *Candida*. As unhas aumentam de espessura (hiperqueratose) ficando endurecidas e grossas. Esta forma pode ser acompanhada de dor e levar ao aspecto de "unha em telha" ou "unha de gavião". A unha pode ficar opaca, esbranquiçada e espessa.



**Figura 2 - Onicomicose subungueal distal e lateral (Rossana Sette 2006).**

### **Onicomicose superficial leitosa**

Ocorre principalmente nas unhas dos dedos dos pés (Elewski 1998, Kaur *et al.* 2008). Observa-se o aparecimento de manchas brancas na superfície da unha (leuconíquia). Com a evolução da infecção

as manchas ficam amareladas e pode resultar na destruição de toda a unha (Figura 3). Esta onicomicose pode ser reconhecida pela presença de uma região bem delineada e opaca (ilhas brancas) na lâmina externa da unha, caracterizada ainda pela localização superficial do fungo na superfície dorsal da lâmina ungueal (Piraccini *et al.* 2004).



**Figura 3 - Onicomicose superficial leitosa (Rossana Sette 2006).**

### **Onicomicose subungueal proximal**

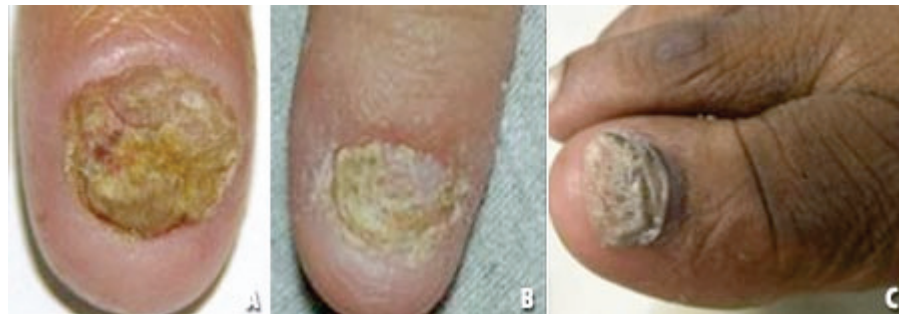
Esta forma inicia-se pela extremidade proximal e é mais rara. Podem ser observadas manchas brancas ou amareladas ao nível da lúnula, comprometendo toda a unha (Figura 4). Posteriormente esta infecção adquire as características da forma subungueal distal. A infecção também pode surgir ocasionalmente em consequência de traumas secundários afectando de forma igual tanto as unhas dos dedos das mãos como as dos pés (Elewiski 1998, Kaur *et al.* 2008). Este tipo de invasão pode ocorrer em associação com perioníquia, no caso de parasitismo por espécies do género *Candida* ou, na ausência de perioníquia, quando é causada por dermatófitos como *T. rubrum* ou mais raramente por *T. mentagrophytes*.



**Figura 4 - Onicomicose subungueal proximal (Rossana Sette 2006).**

### **Onicomicose distrófica total**

Podendo ser a forma evolutiva de qualquer das formas anteriores, nesta forma a unha fica frágil, quebradiça nas porções anteriores para além de deformada. Nas situações mais avançadas, verificam-se apenas alguns restos de queratina no leito ungueal (Figura 5).



**Figura 5 - Onicomicose distrófica total (Rossana Sette 2006).**

### **Onicomicose por candidose**

Nas infecções das unhas por leveduras do género *Candida* a região peri-ungueal fica inflamada, dorida, inchada e avermelhada, podendo apresentar libertação de exsudado purulento na base da unha. Ocorre em pessoas que mantêm as mãos húmidas ou molhadas durante muitas horas por dia, como no caso de certas profissões: lavadeiras, jardineiros, cozinheiras, etc. Também por este facto, é mais comum observar-se nas unhas das mãos. Como passar do tempo esta infecção evolui para oníquia.

Na oníquia observa-se uma alteração da formação da unha, que cresce com a superfície ondulada e/ou com alterações de cor. Pode ocorrer uma modificação da coloração da unha para castanha-amarelada ou amarela-esverdeada e opacificação com posterior destruição total da unha (Figura 6).



**Figura 6 - Oníquia (Rossana Sette 2006).**

### **1.3. Os agentes etiológicos das Onicomicoses**

As onicomicoses são causadas por diferentes agentes etiológicos sendo que os mais comuns são os fungos dermatófitos (80 a 90%), seguidos pelas leveduras (5 a 17%) e fungos filamentosos não dermatófitos (2 a 12%). Os dois últimos grupos são frequentemente relacionados com infecções secundárias, enquanto os dermatófitos causam infecções primárias. Têm sido relatadas infecções mistas, por quaisquer dos agentes etiológicos referidos, não sendo no entanto tão frequentes estes casos (Perea *et al.* 2000, Araújo *et al.* 2003, Kaur *et al.* 2008).

As onicomicoses causadas exclusivamente por dermatófitos, o que sucede em cerca de 54% dos casos, são eminentemente crônicas, manifestando-se por deslocamento da unha, hiperqueratose subungueal, chegando à destruição parcial ou total da unha. Esta patologia pode ocorrer na matriz, no

leito e na placa ungueal e está frequentemente associada a *Tinea pedis* ou a *Tinea interdigitale* (Araújo *et al.* 2003).

Os dermatófitos são responsáveis por aproximadamente 90% das infecções nas unhas dos pés (Elewski 1998) enquanto as espécies do género *Candida*, particularmente a *C. albicans* e *C. parapsilosis*, prevalecem nas unhas das mãos (López & Torres 1999a).

Os agentes fúngicos associados às onicomicoses são muito diversificados. Como já foi referido, os mais comuns pertencem às espécies de fungos queratinofílicos, os dermatófitos dos géneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*, mas também são causadas por leveduras do género *Candida* como *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *Rhodotorula* sp., e por espécies de fungos não dermatófitos pertencentes aos géneros *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, assim como pelas espécies *Scytalidium dimidiatum*, *Scytalidium hyalinum*, *Geotrichum candidum*, *Cladosporium carrionii*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Botryodiplodia theobroma*, *Onychochola canadensis* (Summerbell *et al.* 2005).

### 1.3.1 Fungos Dermatófitos

Os dermatófitos são fungos filamentosos, constituídos por hifas hialinas e septadas. Caracterizam-se principalmente pela actividade queratinolítica que possibilita a invasão de tecidos queratinizados como pele, pêlos e unhas de seres humanos e outros animais (Wagner & Sohnle 1995, Weitzman & Summerbell 1995). Estes fungos são extremamente difundidos por serem facilmente transmissíveis e causam infecções denominadas dermatofitoses, “*Tinhas*” ou “*Tineas*” (Weitzman & Summerbell 1995).

Os dermatófitos patogénicos para o homem dividem-se em três géneros, de acordo com a sua esporulação e com as características dos seus macroconídios, os géneros *Microsporum*, *Trichophyton*, e *Epidermophyton*.

### **Género *Microsporum***

Neste género, as colónias são algodoadas ou pulverulentas, geralmente de tonalidade clara, entre o branco e o castanho muito claro. Produzem macroconídios multiseptados, de paredes grossas, que podem assemelhar-se a fusos ou cilindros, suportados por conidióforos. Invadem a pele e os pêlos. As espécies de interesse médico são as seguintes:

***Microsporum canis*** - É um dermatófito zoofílico transmitido ao homem por diversos animais domésticos principalmente felinos jovens. Atinge cães e gatos, e muitas vezes estes transportam o fungo no pêlo sem lhes causar infecção. Os animais infectados devem ser igualmente tratados para evitar reinoculações nos humanos. Clinicamente, esta espécie é responsável por lesões cutâneas e lesões do couro cabeludo, onde causam grandes placas de alopecia, principalmente em crianças em idade escolar. As lesões exibem uma fluorescência verde clara quando observadas sob a lâmpada de Wood (luz ultravioleta). Em cultura laboratorial as colónias deste fungo atingem a maturidade ao fim de 6-10 dias e apresentam, textura algodoada e tonalidade de branca a amarelo limão. O reverso apresenta-se com a coloração amarelo-limão principalmente em meio de PDA. A microscopia directa da colónia mostra, na maioria das vezes, grande quantidade de macroconídios fusiformes multiseptados (8 a 15 septos) e de paredes grossas, muitas das quais com as extremidades mais pontiagudas curvadas e equinuladas que constituem uma característica marcante desta espécie. Em geral as estirpes desenvolvem poucos microconídios junto às hifas (Lacaz 1998). Um aspecto importante a referir é que *Microsporum canis* não infecta as unhas.

***Microsporum audouinii*** - É um dermatófito que desenvolve macroconídios irregulares muito pouco frequentes e raros microconídios. Apresenta clamidósporos intercalares ou terminais característicos por serem ligeiramente mamilados. As colónias atingem a maturação entre 7 a 14 dias e apresentam micélio aéreo aveludado, de cor branca ou ligeiramente acastanhado. No verso apresentam cor rosa salmão que se desenvolve mais acentuadamente em meio PDA (Potato Dextrose Agar, DIFCO®). É um fungo antropofílico e agente de epidemias de *Tinea capitis* em crianças da Europa e América no Norte.

É transmissível por contacto directo ou através de materiais inertes como pentes e bonés e os cabelos parasitados apresentam fluorescência sob a lâmpada de Wood (Lacaz 1998). Raramente afecta as unhas.

***Microsporum gypseum*** - Espécie geofílica, que infecta o homem através do contacto directo ou indirecto com o solo contaminado. As colónias têm de crescimento rápido pois atingem a maturação entre 3 a 5 dias. Macroscopicamente possuem textura pulverulenta com pigmentação amarelo-acastanhada. O reverso pode apresentar variações de cores que vão do alaranjado ao vermelho. Microscopicamente apresentam grande número de microconídios e macroconídios simétricos, de paredes finas, com 3 a 7 septos, extremidade arredondada e superfície levemente equinulada. São menos fusiformes do que os de *Microsporum canis*, pois apresentam a extremidade distal arredondada (Lacaz 1998). Raramente causa onicomicose.

**Género *Trichophyton*** - É o género mais frequentemente isolado de material clínico, invadindo tanto a pele glabra como os cabelos e unhas. Pode ou não haver produção de macroconídios que, quando existem, ocorrem em pequeno número e têm forma de bastão. Os microconídios, por sua vez, estão distribuídos em grande número ao longo das hifas ou formando cachos. As espécies mais isoladas de infecções humanas são:

***Trichophyton rubrum*** - É uma espécie antropofílica ubíqua e a sua transmissão é exclusivamente inter-humana. Presentemente, é a espécie que mais frequentemente causa tinea dos pés e das unhas dos pés em todo o mundo, principalmente nas zonas cosmopolitas dos países mais desenvolvidos. Em cultura laboratorial em Sabouraud as colónias atingem a maturidade ao fim de 12 a 16 dias.

As colónias apresentam uma textura penugenta, inicialmente com tonalidade branca que, com o passar do tempo, pode manter-se branca ou tornar-se avermelhada ou amarelada com reverso avermelhado. Apresenta grande quantidade de microconídios, regulares e piriformes ao longo das hifas. Os macroconídios, são raros, mas quando presentes, podem apresentar-se como clavias alongadas, quase com um aspecto cilíndrico e com dois a nove septos. É a espécie de dermatófito mais comum no nosso País e é mais frequentemente isolada de lesões de pé-de-atleta e de onicomicoses dos pés, juntamente com o *Trichophyton mentagrophytes* (Lacaz 1998).

***Trichophyton mentagrophytes*** - Embora classicamente possa apresentar algumas variedades, mais recentemente, com o resultado de estudos moleculares, é considerada a existência de um complexo *T. mentagrophytes* ainda não completamente clarificado. Como ainda não é consensual a nova nomenclatura, será feita referência às variedades de maior interesse clínico, segundo a classificação clássica: *T. mentagrophytes* var. *granulare*, uma variedade zoofílica que em agar Sabouraud apresenta colónias de textura pulverulenta com coloração que pode variar do branco-



amarelado ao castanho-avermelhado e com reverso avermelhado e *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, uma variedade antropofílica que apresenta colónias algodoadas, de coloração branco-amarelada e reverso acastanhado. A diferenciação das variedades não é, por vezes, muito evidente, embora a *T. mentagrophytes* var. *granulare* desenvolva um número muito mais elevado de esporos que se reflecte numa maior granulação macroscópica da superfície das colónias.

Microscopicamente, as colónias desta espécie apresentam grande quantidade de microconídios arredondados e agrupados, caracteristicamente dispostas em cruz. Apresentam, em geral raros macroconídios embora os isolados de *T. mentagrophytes* var. *granulare* produzam habitualmente um maior número destes. Com frequência observam-se estruturas de ornamentação, tais com hifas em espiral, características desta espécie. É frequentemente isolado a partir de lesões de pé-de-atleta e de onicomicoses. Diferencia-se de *Trichophyton rubrum* por ser uma espécie urease positiva (Lacaz 1998).

***Trichophyton tonsurans*** - Esta espécie é antropofílica. Em cultura atinge a maturação em 12 a 16 dias após a sementeira. Macroscopicamente as colónias podem variar de penugentas a cerebriformes. Os seus macroconídios são em forma de clava, de dimensões variáveis e largos. Devido ao seu número elevado, as colónias são habitualmente pulverulentas. O verso das colónias tem coloração branca e o reverso apresenta tons variados de castanho a avermelhado em meio de agar Sabouraud. Apresenta numerosos microconídios de formas variadas e a presença frequente de clamidósporos e artrosporos. O seu crescimento é estimulado pela tiamina e a ausência ou presença deste composto em meios quimicamente definidos é fundamental para a identificação desta espécie. Este fungo é frequentemente mencionado como causa de *Tinea capitis* principalmente no continente americano. Raramente infecta as unhas.

***Trichophyton verrucosum*** - Trata-se de um fungo cosmopolita que parasita principalmente bovinos podendo, por contágio, causar esporadicamente lesões em humanos. Clinicamente as lesões do couro cabeludo, pele glabra, e muito frequentemente da barba e bigode são habitualmente muito inflamatórias. Não invade o tecido ungueal. O crescimento desta espécie é muito lento podendo variar entre 13 a 25 dias. A temperatura ótima de incubação é de 37°C. Macroscopicamente, as colónias caracterizam-se por terem uma textura penugenta e coloração do verso que varia do branco ao amarelo ocre. O reverso apresenta-se amarelo com pigmento não difusível pelo meio. A observação microscópica de culturas crescidas em agar Sabouraud não apresenta microconídios nem macroconídios, mas sim uma grande quantidade de cadeias formadas por grandes clamidósporos.

***Trichophyton schoenleinii*** - É um fungo antropofílico sendo o agente da tinha favosa ou favo, para além de infectar igualmente as unhas. Esta espécie tem um crescimento muito lento, variando de 14 a 30 dias até as colónias atingirem a maturação. Estas têm textura penugenta e pigmentação que varia do bege ao castanho-escuro. O reverso apresenta o mesmo tom do verso e não se observa pigmento difusível para o meio. Na microscopia geralmente não são observados macroconídios nem microconídios, mas vêem-se numerosas hifas septadas e em bifurcação, associadas a hifas em forma de candelabro, candelabros fávicos e hifas em forma de cabeça de prego.

### **Género *Epidermophyton***

A espécie mais importante e de interesse médico é o *Epidermophyton floccosum*, um dermatófito antropofílico que invade a pele e unhas, consumindo a queratina. Esta espécie não invade o cabelo ou os pêlos (Lacaz 1998). Apresenta um crescimento rápido atingindo a maturação ao fim de 4 a 6 dias. Macroscopicamente as colónias apresentam textura penugenta, coloração amarela terrosa e nos bordos e do verso das colónias, amarelo - esverdeada. O reverso da colónia tende a acompanhar a coloração do verso. Por vezes difunde pigmento para o meio de cultura.

Microscopicamente caracteriza-se pela presença de macroconídios de parede fina, com 2 a 5 septos e agrupados em cachos, como cachos de banana. Não produz microconídios. A diferenciação do género faz-se através da observação de grandes macroconídios em forma de clava, com paredes lisas, com 2 a 5 células, formados sobre 1 ou 2 conidióforos curtos.

### **1.3.2. Fungos Filamentosos não Dermatófitos**

Como já foi referido atrás, as onicomicoses, são na sua maioria, causadas por fungos dermatófitos, mas uma grande quantidade de fungos não dermatófitos (FND) podem ser isolados com frequência de unhas infectadas (Summerbell *et al.* 2005). Isolamentos repetidos dos mesmos FND permitem concluir com alguma segurança o seu envolvimento como agente causal da infecção da unha (English 1976, Gupta *et al.* 2001a, Summerbell *et al.* 2005). Do ponto de vista clínico, considera-se fungo patogénico aquele que, uma vez erradicado do organismo por acção da terapêutica antifúngica, permite a cura clínica da unha (Maraki 1998). No entanto, saber se o FND é mesmo um agente etiológico da onicomicose, ou se deverá ser considerado um contaminante transitório causal, continua a ser uma questão em aberto.

Os fungos não dermatófitos isolados de unhas constituem um grupo diversificado de géneros, incluindo espécies de *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Scopulariopsis*, *Scytalidium*, *Curvularia*, *Cephalosporium* (Migdley *et al.* 1998, Lopes *et al.* 1999a, Lalitha *et al.* 2007), embora outros FND possam, excepcionalmente, causar onicomicose (Gianni *et al.* 2000). Apenas 1%, dos FND causam alterações na morfologia da unha, contrariamente ao que se observa com os fungos dermatófitos e com as leveduras. (Tosti *et al.* 2000). A identificação directa dos fungos que infectam

as unhas demonstrou que a prevalência de FND nas onicomicoses é elevada (Summerbell *et al.* 2005).

A maioria dos isolamentos de *Fusarium*, *Scopulariopsis brevicaulis* e 50% dos casos de *Aspergillus*, identificados posteriormente em cultura, foram considerados o agente etiológico da doença após sucesso terapêutico.

Como já foi referido anteriormente os dermatófitos são os agentes causais em cerca de 50% das infecções fúngicas das unhas. Num estudo realizado durante 2 anos, em Espanha, foram identificados numerosos isolamentos de fungos não dermatófitos envolvidos em onicomicoses, como espécies de *Fusarium*, *Scytalidium* e *Acremonium*, os quais eram responsáveis por 1,5-6% das onicomicoses (Greer 1995).

O género *Fusarium* foi considerado, até à década de 70, um agente de micotoxicoses e de infecções superficiais. No entanto, mais recentemente, têm sido relatadas com cada vez maior frequência, infecções disseminadas e graves por este agente, especialmente em doentes imunocomprometidos (Guarro & Gene 1995). As espécies mais frequentemente isoladas que produzem infecções no homem são: *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. verticilloides* e com menor frequência *Fusarium dimerum* (Hoog *et al.* 2000). Nas infecções fúngicas da córnea (queratites ou queratomicoses), por exemplo, podem constituir de 6 a 53% de todos os casos de queratites ulcerativas, dependendo do país de origem do estudo (Haneke 1991, Thomas 1994, Vélez *et al.* 1997).

As onicomicoses causadas por espécies do género *Fusarium* quase sempre ocorrem em unhas dos pés que sofreram traumatismos anteriores, com distrofias ou que já apresentavam infecções por dermatófitos (Dordain-Bigot *et al.* 1996, Baran *et al.* 1997). Godoy *et al.* (2004) relataram oito casos de onicomicoses por *F. solani* e *F. oxysporum*, todos confirmados por histologia.

As infecções das unhas por *Fusarium* requerem uma atenção redobrada, devido ao potencial invasivo destes fungos, principalmente em hospedeiros imunodeprimidos (Matsumoto *et al.* 1994). Há relatos

de casos onde infecções fúngicas sistêmicas por *Fusarium* em doentes com cancro tiveram a sua origem a partir de infecções periungueais (Girmentia *et al.* 1992, Nucci 2003).

Existem diferenças geográficas na epidemiologia e etiologia das onicomicoses, especialmente na frequência de cada grupo de fungos responsável pela infecção, em grande parte devido a diferenças na ocorrência das espécies fúngicas na natureza. A título de exemplo, as espécies de *Scytalidium*, um fungo filamentoso não dermatófito, estão nitidamente relacionadas com a localização geográfica, pois é um fungo que existe abundantemente em países tropicais e subtropicais.

Consequentemente, as infecções fúngicas causadas por este género, nomeadamente as onicomicoses, são muito mais frequentes nestas regiões do globo (Ramos & Silva 2000).

### **1.3.3. Leveduras**

Entre as leveduras causadoras das onicomicoses a mais comum é a espécie *Candida albicans*. É considerada como um fungo oportunista, pois existe naturalmente nos hospedeiros e a sua patogenicidade depende de condições locais e sistêmicas, a partir do momento em que estas se tornam adequadas para o seu crescimento (Giandoni 1994, Tsuboi *et al.* 1994). Quando invadem o tecido ungueal, as leveduras do género *Candida* provocam alterações que vão desde o aparecimento de cor amarelada, negra ou esverdeada na superfície da unha, perioníquia, queratose subungueal, leuconíquia e onicólise.

As espécies de leveduras responsáveis, com maior frequência, por onicomicoses são, para além de *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. ciferii*, *C. sake*, *C. haemulonii*, *C. famata* e *C. zeylanoides* (López & Torres 1999a, Rao *et al.* 2004). As onicomicoses causadas por leveduras são a causa mais frequente de patologia ungueal, nas mãos (Minelli 1996).

O seu tratamento é demorado, particularmente nas unhas dos pés, por estas crescerem mais lentamente que as das mãos (Campbell 1996). Das espécies de *Candida*, *C. parapsilosis* apresenta, para muitos autores, uma forte incidência entre as demais pois encontraram esta espécie com maior frequência em raspados ungueais (Kurtzman & Fell 1998, Midgley & Moore 1998, Gautret & Rodier 2000, Silva *et al.* 2005). Entretanto, outros trabalhos demonstraram predominância de *C. albicans* como agente de onicomicose (Lopes *et al.* 1999, Pontes *et al.* 2002) e este facto pode ter a ver com diferenças na sua distribuição geográfica. Ambas as espécies são capazes de aderir ao leito ungueal causando leuconíquia.

A candidose das unhas é uma das infecções superficiais mais frequentes causadas por leveduras do género *Candida*. Os factores que aumentam a predisposição à doença são as actividades ocupacionais associadas a perturbações circulatórias periféricas como a fragilidade vascular e a resistência diminuída para as infecções, que facilitam a invasão dos tecidos pelo fungo.

Como factor de precipitação, podemos citar os traumatismos quer os acidentais, como em actos de manicura, ou por roer as unhas (onicofagia). A infecção piogénica por *Staphylococcus aureus*, pode associar-se à infecção fúngica e estas situações observam-se com relativa frequência.

Os factores de manutenção das infecções podem ser variados como a profissão (imersão dos dedos em água durante longos períodos e maceração) o clima (sensibilidade ao frio), o contacto com a terra, detergentes e químicos assim como a disfunções hormonais (menopausa, obesidade, diabetes). As infecções nas unhas por *Candida* sp. ocorrem mais frequentemente em doentes com candidose mucocutânea familiar crónica. Nestes casos as onicomicoses podem afectar tanto as unhas das mãos, como as unhas dos pés.

## **1.4. Diagnóstico Laboratorial das Onicomicoses**

O diagnóstico laboratorial convencional das onicomicoses é baseado no historial clínico do doente e inclui o exame directo e a cultura das amostras. O diagnóstico clínico, baseado somente nas características clínicas das lesões tem-se revelado muitas vezes, insuficiente levando a erros terapêuticos (Torres-Rodríguez & Jodra 2000). O aspecto clínico das lesões causadas por fungos pode mimetizar perfeitamente outro tipo de afecções, como por exemplo espessamentos resultantes de traumatismos, lesões ungueais de psoríase e até tumores sub-ungueais. Assim, o diagnóstico micológico é extremamente importante para definir a verdadeira causa da lesão e auxiliar na escolha da terapêutica adequada que será aplicada no tratamento da onicomucose (Rubio *et al.* 1999).

Infelizmente a prescrição de uma terapêutica empírica, sem a confirmação laboratorial adequada, tem conduzido inúmeros doentes a graves situações de saúde devido à elevada toxicidade dos antifúngicos utilizados no tratamento de onicomicoses que não tinham. Torna-se assim necessário otimizar novos métodos de diagnóstico das onicomicoses, mais sensíveis e mais rápidos, para que o seu tratamento seja o adequado.

### **1.4.1. Colheita e Processamento do Material Clínico**

No diagnóstico laboratorial das onicomicoses bem como das dermatofitoses e de outras micoses, a colheita do material clínico assim como a sua conservação e transporte devem ser realizados de forma adequada, já que estas influenciarão substancialmente no resultado final e o êxito do exame laboratorial (Davey *et al.* 1996, Evans 1989).

Antes da realização da colheita do material biológico, é importante assegurar que o doente não esteja a fazer medicação anti-fúngica no momento da colheita, quer tópica ou sistémica. Nesta situação, é necessário que haja a suspensão do uso da medicação por pelo menos, uma semana antes da colheita do material para análise.

É importante também ter em consideração a quantidade de material a ser colhido. Deve-se procurar recolher uma quantidade de material que seja suficiente para a realização de pelo menos dois exames laboratoriais, embora em algumas situações, devido à pouca descamação observada na lesão, não seja possível recolher grande quantidade de material.

Uma vez que o material biológico obtido é sólido, pode ser transportado em recipientes secos mas esterilizados, como por exemplo, entre duas lâminas de microscopia, em placas de Petri pequenas ou mesmo em envelopes de papel resistentes.

As unhas extraídas por processos cirúrgicos não são adequadas ao exame micológico. As unhas com resíduos medicamentosos, esmalte ou verniz são igualmente consideradas amostras inadequadas.

#### **1.4.2. Microscopia Directa**

Qualquer amostra submetida ao exame micológico deve começar por ser examinada microscopicamente, para pesquisa de elementos fúngicos. Este exame é complementar, não devendo nunca substituir a cultura.

Para além de fornecer informação antecipada para a possibilidade de instituir de imediato o tratamento (ex: por observação de filamentos septados, de células ou de esporos), também pode ser útil na determinação da importância patogénica do organismo que mais tarde será identificado a partir da cultura (Larone 1996, Kwon- Chung & Bennett 1992).

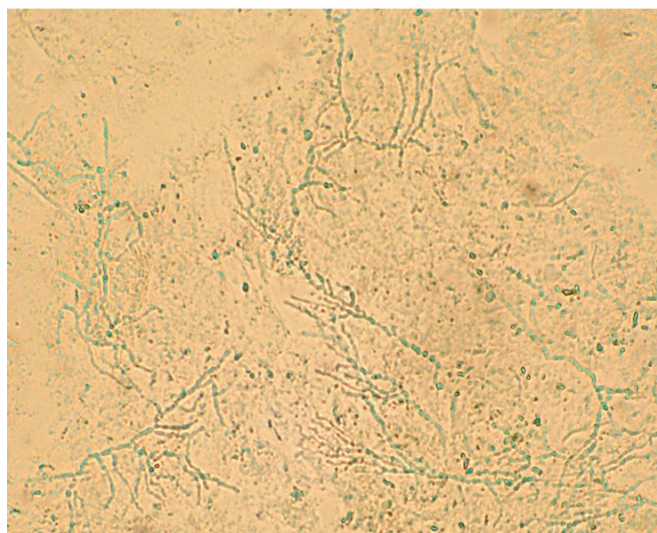


A observação dos exames directos de fragmentos de unhas permite a visualização microscópica dos fungos existentes na amostra, ou seja, a sua morfologia *in vivo*. Para clarificar as preparações, utiliza-se a acção degradativa do Hidróxido de Potássio (KOH). Na presença de substâncias fortemente alcalinas, qualquer substância orgânica que possa ser confundida com elementos fúngicos, quando observada através do microscópio, desaparece quase completamente, deixando o fundo praticamente limpo. Como os fungos não são afectados por estas substâncias, ficam mais visíveis (Figura 7). Assim, a adição de KOH à preparação, ajuda a observar mais nitidamente os elementos fúngicos (Larone 1996). Na observação microscópica em diagnóstico micológico é utilizada uma solução 10-30 % KOH.

O exame directo é um teste muito rápido, embora no caso das unhas necessite de mais tempo devido à espessura das aparas, dando origem a 5 a 10% de resultados falso negativos. A amostra de unha é examinada de forma a pesquisar hifas, artrosporos ou células fúngicas.

A desvantagem de utilizar este composto advém do facto de este reagir com algumas amostras biológicas (ex. pus), produzindo artefactos que se assemelham

a hifas ou células em gemulação. O número de artefactos aumenta com o tempo de actuação do KOH na amostra, antes de se proceder à observação (Kwon- Chung & Bennett 1992). Fica assim difícil conservar as amostras durante vários dias pois este composto precipita, e com o tempo cristaliza,



**Figura 7 - Exemplo de exame directo em KOH, onde se podem observar claramente hifas de um fungo filamentoso.**

impedindo assim a observação. No entanto este problema pode ser contornado deixando a amostra em câmara húmida durante 2 ou 3 dias.

### **1.4.3. Diagnóstico Cultural**

A cultura é o único método pelo qual o microrganismo causador da doença pode ser identificado. As unhas são amostras á partida não esterilizadas e por isso deve-se ter cuidado com as contaminações, quando da realização da cultura, na medida em que muitos fungos contaminantes habitualmente saprófitas do meio ambiente, podem ser os verdadeiros agentes causadores da doença. Sem garantir previamente a assepsia da colheita e do transporte das amostras clínicas, não poderemos inferir a verdadeira etiologia da infecção.

O primeiro passo a dar no exame cultural consiste na escolha do meio de cultura mais apropriado ao crescimento de todo e qualquer fungo existente na amostra biológica. Este pode ser simples ou podem ser-lhe adicionados compostos que inibam o crescimento de outros microrganismos.

Como exemplo de um inibidor, falamos da cicloheximida que é incorporada nos meios de cultura quando se pretende inibir o crescimento de fungos saprófitas. Estes, por terem um crescimento mais rápido, impediriam os fungos patogénicos de se desenvolver. A cicloheximida é geralmente utilizada no isolamento de fungos dermatófitos que têm uma taxa de crescimento relativamente lenta em relação aos FND. Sabe-se ainda que a cicloheximida inibe o crescimento de alguns patogénicos importantes, como algumas espécies dos géneros *Candida*, *Aspergillus* e *Fusarium*. Assim, será sempre necessário usar simultaneamente meios de cultura sem cicloheximida, para permitir o crescimento dos fungos habitualmente saprófitas ou contaminantes, que podem actuar como patogénicos oportunistas, como os fungos não dermatófitos causadores de onicomicoses.

Os fungos não-dermatófitos, como as espécies de *Scytalidium*, *Scopulariopsis*, *Aspergillus*, e *Acremonium*, são susceptíveis a cicloheximida em graus variados, o que pode ajudar no seu diagnóstico. A maioria desses fungos cresce mais rápido na cultura do que os dermatófitos e isso acontece também nos casos de infecções com multietiologia. Várias culturas (com e sem cicloheximida) são, portanto, essenciais quando da suspeita de múltiplos fungos.

O cloranfenicol e/ou a gentamicina são compostos anti-bacterianos normalmente usados para inibir o crescimento bacteriano que, se for abundante, pode igualmente inibir o crescimento de qualquer fungo, tanto de dermatófitos como de FND (Larone, 1996; Kwon-Chung & Bennett, 1992).

A temperatura ótima para o crescimento da maioria dos fungos isolados de amostras clínicas é de 30°C mas é possível realizar a incubação à temperatura ambiente (25°C). A maioria das culturas deve ser incubada durante pelo menos, 4 semanas antes de serem consideradas negativas. No entanto, as culturas de leveduras necessitam apenas de 3 a 5 dias de incubação para serem então identificadas (Larone 1996). Para a identificação dos fungos patogênicos é essencial tanto o aspecto macroscópico das culturas, como o seu aspecto microscópico.

É importante que o meio de cultura escolhido permita a formação das características macroscópicas, próprias de cada organismo, mas também a formação das estruturas microscópicas características.

Assim, por vezes, é necessário fazer subculturas em outros meios de cultura (Corn-meal, PDA, Sabouraud, Malte, *Trichophyton* agar, etc.), para além do meio inicialmente usado para o seu isolamento. As subculturas em meios mais ricos ou mais pobres em nutrientes, regra geral estimulam a produção de estruturas identificadoras da espécie por parte do fungo em consequência do choque nutritivo.

Outro aspecto importante a ter em conta quando se procede ao exame cultural é a escolha do recipiente apropriado, tais como placas de petri ou tubos de ensaio. As primeiras têm a desvantagem de ter ser mais susceptíveis à contaminação. Contudo, oferecem uma maior área, pelo que devem ser

usadas quando existem poucas colónias, para aumentar a probabilidade de isolamento do fungo. As placas de Petri são mais usadas para contagem de colónias de leveduras a partir de amostras clínicas à partida contaminadas por outros microrganismos ou para isolamento de colónias de culturas mistas. No caso dos tubos de ensaio, as tampas metálicas devem sempre permitir a circulação de ar (oxigénio), já que os fungos são organismos aeróbios (Kwon-Chung & Bennett 1992). A utilização de rolhas de algodão cardado é preferível porque impede a infestação das culturas por ácaros ao mesmo que permite as trocas gasosas com o meio ambiente.

Os tubos de ensaio com meio inclinado são os mais adequados para o desenvolvimento de fungos filamentosos porque o meio desidrata mais lentamente permitindo incubações prolongadas.

Por outro lado, a abertura dos tubos sendo apertada, impede a entrada e saída de esporos e consequentes contaminações das culturas e do ambiente.

Após a inoculação e incubação recomendada, o meio de cultura deve ser observado a cada 2-3 dias, para verificar a presença de crescimento de colónias fúngicas. Os fungos com crescimento rápido estarão presentes na segunda ou terceira vez que os tubos são examinados, enquanto os fungos com crescimento lento poderão não ser evidentes antes de 2 a 3 semanas ou mais.

As leveduras patogénicas têm um crescimento muito mais rápido que os fungos filamentosos. Entre 3 a 5 dias atingem a maturação e são identificadas através da observação das suas características fisiológicas e bioquímicas.

No caso das culturas de fungos filamentosos, cujo desenvolvimento é mais lento, deve-se anotar a textura da superfície das colónias, a cor do verso e do reverso e os pigmentos libertados para o meio de cultura (Larone 1996, Kwon- Chung & Bennett 1992), após crescerem e atingirem a maturação. Estes parâmetros dão-nos informações fundamentais para a identificação da espécie. Na Tabela 1 estão resumidos os critérios mais importantes utilizados na identificação dos fungos filamentosos isolados de infecções, nomeadamente de onicomicoses.

A observação microscópica das culturas deve ser feita pelo menos duas vezes ao longo do seu desenvolvimento: assim que a cultura começa a crescer e a formar conídios ou esporos e alguns dias depois. Em muitos casos, a esporulação, de extrema importância para a identificação da espécie do fungo, ainda não é visível nas colónias muito jovens mas também já não o é em culturas antigas. Assim, existem vários métodos para examinar microscopicamente os fungos, sendo um deles a preparação de culturas em lâmina. Este é o melhor método para preservar e observar a verdadeira estrutura dos fungos. Não é uma técnica rápida, mas um método insuperável quando se pretende estudar todos os pormenores da morfologia microscópica dos fungos (Larone 1996).

**Tabela 1 - Principais critérios utilizados para a identificação das espécies de fungos patogénicos filamentosos (Rippon 1988, Clayton & Midgley 1989, Lacaz *et al* 1991)**

<b>Crítérios</b>	<b>Parâmetros que podem ser observados</b>
Macromorfológicos	Velocidade de crescimento, textura, topografia e cor do micélio. Formação de pigmento no reverso nas colónias e nos meios de cultura.
Micromorfológicos	Forma, dimensões e distribuição/agrupamento dos esporos (macroconídios e microconídios). Presença de hifas modificadas: hifas em espiral, candelabros fávicos, hifas em forma de raquete e clamidósporos.
Fisiológicos	Assimilação de ureia, crescimento em presença de vitaminas (tiamina, ácido nicotínico), aminoácidos (histidina) e álcoois (inositol); perfuração dos cabelos <i>in vitro</i> .

#### **1.4.4. Métodos Moleculares de Diagnóstico**

Uma das limitações do método clássico na identificação dos fungos filamentosos consiste na necessidade de ter condições nutritivas favoráveis, sem as quais os fungos não produzem as

estruturas reprodutivas que permitem a sua identificação, o que pode levar a um diagnóstico errôneo do agente etiológico em questão.

Por vezes têm surgido algumas dificuldades na identificação de certos isolados clínicos, causadas pela variabilidade natural das espécies, pleomorfismos ou mutações espontâneas, aumentando a falibilidade do diagnóstico convencional baseado na cultura.

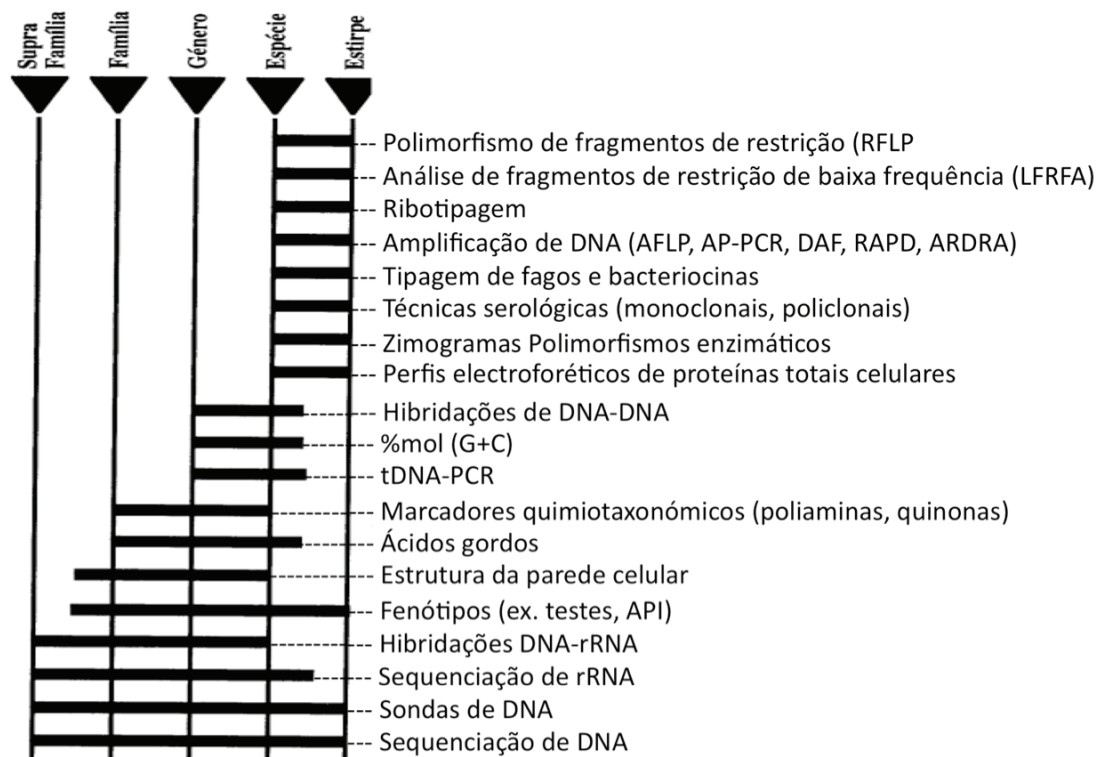
Muitas vezes as diferentes fases sexuada e assexuada de um mesmo genótipo, têm sido classificadas como sendo espécies distintas, causando nestes casos dificuldades acrescidas na distinção dos fungos (Carlile & Watkinson 1994). Um exemplo típico é o que sucede com o fungo patogénico *Pseudallescheria boydii* que é a forma teleomorfa de *Scedosporium apiospermum*, os quais têm sido erradamente considerados muitas vezes como espécies distintas.

Nos últimos anos, e com o intuito de aumentar a eficácia do diagnóstico laboratorial, têm sido desenvolvidos e testados novos métodos de identificação de fungos patogénicos utilizando metodologias moleculares. Embora não sendo ainda universalmente aplicadas na rotina laboratorial em Micologia Médica, têm-se revelado muito promissoras, principalmente devido à sua rapidez e elevada sensibilidade e especificidade.

Na verdade, as técnicas moleculares de classificação e identificação utilizadas no estudo das relações filogenéticas entre as diferentes espécies podem ser utilizadas no diagnóstico de fungos patogénicos e, deste modo, contribuir significativamente para uma melhoria na eficácia do diagnóstico.

A capacidade de determinar a sequência do DNA genómico veio revolucionar as investigações na área de saúde. O DNA e o RNA têm sido usados e aplicados em microbiologia clínica para a classificação e identificação, tanto de bactérias como de eucariotas, incluindo os fungos (Iwen *et al.* 2002). A utilização de métodos moleculares como a sequenciação da região D1/D2 do DNA ribossómico na identificação de fungos, permitiu tanto o diagnóstico de microrganismos, como de análises filogenéticas, epidemiológicas e estudos de genética de populações.

Na Figura 8 está representado um esquema das técnicas convencionais e moleculares que podem ser utilizadas em estudos de taxonomia polifásica e da sensibilidade das mesmas como diferenciadoras de grupos taxonómicos. Enquanto algumas destas técnicas permitem unicamente a distinção dos organismos até à espécie (estrutura da parede celular, análise fenotípica), outras, mais finas, permitem a distinção entre indivíduos da mesma espécie (RFLP, ribotipagem e sequenciação). A região ITS do DNA ribossómico tem sido uma das regiões genómicas mais utilizadas pela capacidade que tem de permitir a discriminação das espécies de fungos (Gardes & Bruns, 1996; Pritsch *et al.*, 1997; Glen *et al.*, 2001) e a análise das suas sequências tem sido muito utilizada em estudos filogenéticos.



**Figura 8 - Técnicas utilizadas em estudos de taxonomia polifásica**  
(adaptada de Vandamme *et al.* 1996)

A análise das sequências apresenta como principal vantagem a identificação rigorosa e inequívoca da existência de um determinado organismo através do alinhamento das sequências obtidas com sequências depositadas em bases de dados públicas.

## **1.5. Objectivos do Trabalho realizado e Plano da Dissertação**

A incidência das micoses tem vindo a aumentar nas últimas décadas. Com o crescente aumento de inúmeros factores de risco, como obesidade, diabetes, protocolos de imunossupressão para transplantados e doentes do foro oncológico, qualquer isolado deve ser considerado como potencial patogénico, desde de que observadas as boas práticas laboratoriais.

Mesmo os fungos dermatófitos, usualmente considerados de pouca importância clínica representam um custo elevado em cuidados de saúde, principalmente quando não é estabelecido um diagnóstico correcto.

Neste contexto, realça-se a importância que o diagnóstico micológico representa na medicina em geral, principalmente para a prescrição do tratamento adequado a uma determinada patologia fúngica. O presente trabalho teve como principais objectivos:

- aquisição de conhecimentos que permitissem um correcto diagnóstico micológico das onicomicoses, através do correcto isolamento e identificação das espécies de fungos causadoras de infecção.
- investigar a possibilidade de extrair DNA fúngico directamente de amostras de unhas com infecção a fim de posteriormente se poder proceder a um diagnóstico rápido e directo das onicomicoses através da identificação molecular dos agentes etiológicos, sem que fosse necessário isolar os fungos em cultura. Como controlo, paralelamente foram utilizadas metodologias convencionais baseadas no



isolamento e identificação dos agentes etiológicos em cultura a partir de fragmentos de unhas provenientes de doentes com infecção

O diagnóstico molecular começou com a extracção do DNA fúngico das mesmas amostras clínicas que, após amplificação da região ITS dos genes ribossómicos foi utilizado para confirmação e comparação dos resultados. Foi igualmente estudada a ocorrência de fungos não dermatófitos responsáveis por onicomicose.

Como já foi referido, o diagnóstico convencional é bastante moroso e condiciona a administração de medicação para o controlo da infecção. Deste modo foi importante investigar se era possível obter resultados satisfatórios, extraindo o DNA directamente das amostras de unhas infectadas.

As principais questões colocadas antes da realização deste trabalho foram as seguintes:

- Será possível extrair DNA fúngico directamente de unhas com infecção?
- Esses resultados são semelhantes aos obtidos no diagnóstico laboratorial utilizando métodos convencionais?
- Este processo diminui significativamente o tempo de obtenção de um diagnóstico fiável permitindo a instituição mais atempada e rigorosa da terapêutica?
- O processo de extracção de DNA, de amplificação e da análise das sequências, torna o processo mais dispendioso que o diagnóstico convencional?
- Justifica-se realizar este processo em qualquer tipo amostra clínica?

Procurou-se então responder a todas estas questões no decorrer desta dissertação, a qual foi dividida em quatro capítulos. No primeiro capítulo é feita uma introdução geral sobre a importância das micoses superficiais, com destaque para as infecções fúngicas das unhas e seus agentes etiológicos para além de serem ainda referidos os métodos que podem ser utilizados no diagnóstico laboratorial das mesmas.

No segundo capítulo são exemplificados os materiais e métodos utilizados no decorrer deste trabalho, tanto do diagnóstico convencional, que assenta basicamente no exame directo das amostras clínicas e na identificação das colónias fúngicas crescidas em meio de cultura, como das metodologias moleculares empregues para um possível diagnóstico molecular das onicomicoses. Neste capítulo estão descritas o tipo de amostras estudado, assim como a sua forma de acondicionamento e transporte. Foi também descrito os procedimentos realizados aquando da abordagem convencional, exame directo e exame cultural. Na descrição dos procedimentos de diagnóstico molecular realizados neste trabalho podemos observar todos os passos realizados desde a extracção, quantificação, reacção de P.C.R, purificação e sequenciação.

O terceiro capítulo é dedicado à apresentação e interpretação dos resultados obtidos e sua discussão. Finalmente, no quarto capítulo são apresentadas as conclusões finais e tecidas algumas considerações sobre os resultados obtidos no presente trabalho.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

## **2.1. Origem das Amostras Clínicas**

Neste trabalho, foram estudadas 54 amostras recolhidas de unhas de doentes com hipótese clínica de onicomicose. Todas as amostras foram estudadas no Laboratório de Micologia do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, e tinham proveniência de várias instituições, nomeadamente Hospital Egas Moniz, da consulta de Dermatologia do Hospital da Cuf/Infante Santo, consultas privadas e das análises realizadas no Laboratório de Micologia do IHMT (Anexo 1, Tabela 5).

## **2.2. Colheita e Transporte do Material Clínico**

Após o exame clínico do doente e antes de proceder à colheita, as unhas infectadas seleccionadas foram previamente limpas com álcool a 70%. A colheita foi efectuada por raspagem da unha com uma lima grossa, o mais possível próximo da base da unha, de forma a colher a unha já desfeita, sob a forma de pó. As unhas foram preferencialmente raspadas na sua área distrófica ou descorada, até quase atingir o leito ungueal.

Os fragmentos de unhas danificadas e esfareladas foram colhidos por raspagem com o bisturi ou com tesoura esterilizados. O material pulverulento que se forma por debaixo da unha foi colhido com bisturi esterilizado. Nos casos de perioníquia o pus formado foi recolhido com a própria ansa esterilizada, que foi em seguida utilizada na inoculação do material nos meios de cultura.

Na altura da realização da colheita do material biológico deve-se respeitar a questão do crescimento radial do fungo na lesão. Evitou-se recolher material em áreas lesionadas mais antigas, na região

distal das unhas infectadas, pois o fungo geralmente se apresenta em menor quantidade ou com pouca viabilidade nestes locais.

Foi tomada em consideração a colheita de material em quantidade suficiente para, caso fosse necessário, realizar pelo menos dois exames laboratoriais completos que incluem, cada um, um exame directo e seis ou mais inóculos em meios de cultura.

Tal como referido anteriormente, para que o resultado do exame laboratorial seja credível, a colheita tem de ser a mais profunda possível no sentido da raiz da unha, onde se encontra fungo viável. Os elementos fúngicos existentes na extremidade distal têm grande probabilidade de ser inviáveis e escassos por serem mais antigos.

Na tabela 2 são esquematizados os diferentes métodos utilizados na recolha do material biológico a partir de onicomioses.

**Tabela 2 - Quadro resumo da metodologia utilizada na recolha de amostras clínicas dos diferentes tipos de onicomiose**

<b>Forma Clínica</b>	<b>Recolha de Amostra</b>
Onicomiose Subungueal Distal e Lateral	Realizada com bisturi de ponta fina ou lima grossa, raspando por debaixo da lâmina ungueal, retirando o material existente entre a zona saudável e a zona afectada.
Onicomiose Subungueal Proximal	Raspagem ao nível da lâmina exterior da unha e progressivamente raspar em profundidade para se realizar a recolha da amostra o mais próximo possível do leito ungueal.
Onicomiose Superficial Leitosa	Raspagem intensa da zona afectada na superfície externa da lâmina ungueal.
Onicomiose Distrófica Total	Raspagem com lima grossa ou bisturi a região superficial e subungueal da unha, o mais profundamente possível, junto do leito ungueal. Desprezar o material ungueal com infecção mais antiga. Recolher o exsudado se existir.
Lesões com Perioníquia	Raspagem por debaixo da região peri-ungueal. Colheita de descamação da região peri-ungueal. Colheita do exsudado com ansa ou zaragatoa.

O material recolhido foi armazenado entre duas lâminas de microscopia esterilizadas, as quais foram embrulhadas em papel não poroso. No exterior foram escritos de imediato os dados do doente (nome, idade, sexo, local da infecção, nome da consulta/ médico e data da colheita).

Enquanto não foi processado laboratorialmente, o produto foi conservado à temperatura ambiente entre as duas lâminas de microscopia embrulhadas em papel mantendo-se, desta forma, viável durante meses ou anos.

## **2.3. Diagnóstico Convencional das Infecções**

### **2.3.1. Processamento Laboratorial das Amostras**

As amostras foram tratadas à chama de bico de Bunsen e não em câmara de fluxo laminar, de modo a evitar perdas de material provocadas pela sucção do ar da câmara. Antes de se iniciar o exame micológico o processamento laboratorial começou com a homogeneização de todas as amostras com o auxílio de uma pinça e bisturi. Em seguida foi retirada uma pequena porção para exame directo e da restante porção fez-se a sementeira em diferentes meios de cultura.

### **2.3.2. Exame Directo das Amostras**

O diagnóstico directo através da microscopia serviu principalmente como teste de rastreio para determinar a presença ou ausência de elementos fúngicos. Todas as 54 amostras clínicas incluídas neste trabalho foram testadas por este método.

O exame directo foi montado entre lâmina e lamela numa gota de KOH 20% para desfazer as estruturas não fúngicas. A observação foi feita num microscópio óptico Olympus B071 com as

ampliações de 150x e de 600x. Ao microscópio, foram pesquisadas formas parasitárias de fungos, ou seja a sua morfologia *in vivo* tal como se encontravam nas lesões dos doentes e registada a sua presença ou ausência: filamentos septados e artrosporos ou outros esporos, e/ou, no caso das leveduras, células fúngicas isoladas ou em gemulação.

### **2.3.3. Isolamento e Identificação dos Fungos em Cultura**

O exame cultural é o único teste na metodologia convencional que permite diferenciar e identificar os agentes etiológicos. Todas as amostras foram semeadas, num número de três inóculos por cada tubo de ensaio, em dois meios de cultura diferentes: meio de Sabouraud (DIFCO, Detroit – Michigan, USA) adicionado de cloranfenicol e meio de Sabouraud adicionado de cicloheximida e cloranfenicol.

O primeiro permite por um lado o crescimento de todo e qualquer fungo existente na amostra clínica, incluindo os fungos habitualmente saprófitas que podem causar infecção e, por outro, impede o desenvolvimento das bactérias que tendo um crescimento mais rápido, poderiam impedir o crescimento dos fungos.

O segundo meio de cultura é mais selectivo e é utilizado para o crescimento dos fungos dermatófitos que são resistentes à cicloheximida. Para além do cloranfenicol impedir o crescimento das bactérias a cicloheximida impede o crescimento de muitas espécies de fungos saprófitas e também de algumas leveduras patogénicas. Deste modo os fungos dermatófitos, que têm um crescimento mais lento, têm oportunidade de se desenvolver sem impedimentos.

A cultura dos fungos filamentosos a partir das amostras incluídas neste trabalho requereu entre 2 a 4 semanas até as colónias atingirem a maturidade, quer macroscópica quer microscopicamente. Em alguns casos os resultados da identificação foram atrasados pela ausência de características

específicas tanto macroscópicas como microscópicas nas primoculturas. Foi então necessário fazer novas culturas em meios específicos de forma a estimular o seu aparecimento.

No exame macroscópico das colónias foi observada a sua taxa de crescimento, a cor e textura da sua superfície, o bordo das colónias, a cor do seu reverso e a eventual produção de pigmento e sua difusão para o meio de cultura.

No exame microscópico das colónias foi fundamental ter em conta vários aspectos, como a forma, número e disposição dos macroconídios e dos microconídios em relação ao resto do micélio, e de aspectos particulares da sua organização e outras estruturas peculiares essenciais para a identificação da espécie do fungo.

O isolamento de leveduras a partir das amostras estudadas requereu 2 a 5 dias de incubação e a identificação das espécies isoladas foi feita através de testes fisiológicos e bioquímicos, pois estes fungos são macro e micromorfologicamente muito semelhantes entre si.

O Teste da Blastese foi utilizado na identificação da espécie *C. albicans* e todas as restantes leveduras foram identificadas utilizando as galerias API ID32C (BioMerieux®).

## **2.4. Extracção Directa de DNA Fúngico a Partir de Unhas Com Infecção**

Na realização de procedimentos que envolvam técnicas de biologia molecular, é de extrema importância não descurar determinados protocolos de trabalho que se revelam essenciais para o êxito dos resultados. Assim, em todas as etapas, foram tomadas sempre as medidas adequadas para prevenir a contaminação das amostras nas diferentes fases de processamento. Os vários procedimentos do diagnóstico que envolvia técnicas moleculares foram realizados em locais fisicamente separados e extracção do DNA foi realizada numa câmara de fluxo laminar classe II para garantir a assepsia no processo de extracção.



A extracção de DNA fúngico de todas as amostras incluídas neste trabalho foi realizada utilizando um sistema de isolamento de ácidos nucleicos, o QuickGene<sup>®</sup>, que permite o isolamento rápido de DNA ou de RNA a partir de variados tipos de amostra, com elevada qualidade e quantidade, e ainda com elevados níveis de reprodutibilidade e fiabilidade. O QuickGene-810<sup>®</sup> é um sistema automatizado multifuncional de extracção de ácidos nucleicos, enquanto o QuickGene-Mini80<sup>®</sup>, que foi utilizado neste trabalho é um sistema compacto, pessoal e acessível de isolamento de DNA ou de RNA.



**Figura 9 - QuickGene Mini80<sup>®</sup> da FUJIFILM.**

O QuickGene-Mini80<sup>®</sup> (Figura 9) é um equipamento compacto que vem facilitar o processo de isolamento manual de DNA/RNA, uma vez que dispensa os morosos passos de centrifugação (inclusive do consequente descartar do sobrenadante), obrigatórios nos procedimentos de extracção manual de ácidos nucleicos. Através do QuickGene Mini80<sup>®</sup>, a amostra é pressionada contra a membrana por pressão de ar moderada, permitindo o isolamento de ácidos nucleicos de elevada integridade, sem perdas de material e sem possibilidade de contaminação cruzada.

A tecnologia QuickGene utiliza uma membrana porosa e muito adsorvente, desenvolvida através da aplicação da tecnologia avançada de produção de membranas de polímeros, propriedade da

FUJIFILM. Esta membrana ultra fina permite a extracção de ácido nucleico num intervalo de tempo muito inferior ao obtido com membranas de fibra de vidro.

Devido à sua natureza hidrofílica, os ácidos nucleicos ficam adsorvidos na membrana, enquanto proteínas e lípidos que são, comparativamente, hidrofóbicos, tendem a passar através da membrana.

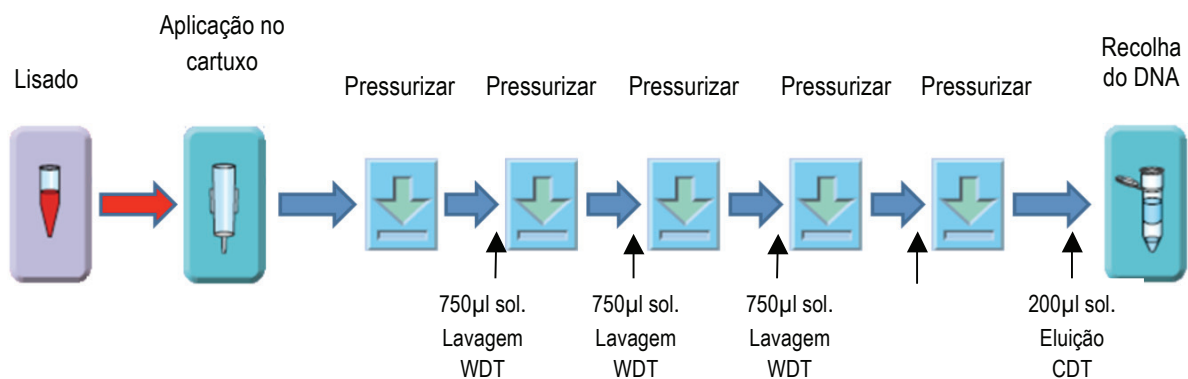
O sistema QuickGene é ainda notabilizado pelo isolamento de DNA ou de RNA de 8 amostras de sangue simultaneamente, em poucos minutos, isolamento de RNA sem risco de contaminação com ribonucleases e resultante degradação, uma vez que o processo de extracção decorre automaticamente num espaço fechado e selado e, por último, na ausência quase total de impurezas, como proteínas ou sais, dos produtos isolados, permitindo a sua utilização directa em reacções posteriores como PCR, RT-PCR, digestão com enzimas de restrição, Southern e Northern blotting.

De acordo com o protocolo fornecido pela FUJIFILM, para extracção de DNA fúngico directamente das amostras de unhas utilizando o QuickGene DNA Tissue kit S, as amostras de unhas seleccionadas para a realização deste estudo foram inicialmente lavadas vigorosamente com Etanol a 100% e posteriormente com água destilada. Em seguida foram cortadas de modo a ficarem o mais finas possível, sabendo que o resultado do corte da amostra iria estar directamente relacionado com eficácia da lise a mesma. As amostras foram colocadas em eppendorfs de 1,5 ml e em seguida foi adicionado 200 a 300 µl da solução 2,5 Molar MDT (dithiothreitol- Tissue Lysis Buffer).

As amostras então foram incubadas em agitação a 55°C durante toda a noite, até os fragmentos de unha ficarem completamente transparentes. O tempo necessário para que tal aconteça depende da espessura dos fragmentos, mas em média necessitava de cerca de 2 horas por cada 5 mg de material. Findo esse tempo, as suspensões foram centrifugadas a 2 000 g à temperatura ambiente durante 3 a 5 segundos para remover o sobrenadante (MDT), após o que foram adicionados 180 µl de MDT e 20µl de EDT (Proteinase K).

As amostras foram novamente incubadas durante a noite em agitação a 55°C, para que se processe à lise completa das unhas. Findo esse tempo foram centrifugadas a 7 000 g à temperatura ambiente durante 3 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, desprezando o sedimento (material insolúvel). Foram adicionados 180 µl de LDT (Lysis Buffer), incubados a 70°C durante 10 minutos, após o que foram adicionados 240 µl de Etanol a 99%.

O lisado obtido é então transferido para o Sistema Automático de Isolamento de Ácido Nucleico, método QuickGene® da FUJIFILM e seguido o procedimento fornecido pelo fabricante. A utilização da solução de lavagem (WDT) e da solução de eluição (CDT) foi feita de acordo com o procedimento fornecido pelo protocolo fornecido pela FUJIFILM. Na Figura 10 estão representados os passos seguidos para a extracção final do DNA por este método. No final do processo as amostras obtidas são guardadas a -20°C e, a esta temperatura, mantêm-se estáveis durante alguns meses.



**Figura 10 - Esquema da extracção final do DNA das amostras pelo método QuickGene® da FUJIFILM.**

## 2.5. Diagnóstico Molecular de Onicomicoses

Como já foi referido atrás, as técnicas moleculares são de tal forma sensíveis e passíveis de contaminações que implicam que em todas as etapas sejam tomadas medidas adequadas para se evitar a ocorrência de resultados falso positivos. Em consequência, os vários procedimentos foram realizados em locais fisicamente separados e, na preparação das amostras para a reacção de PCR de modo a evitar qualquer tipo de contaminação:

- respeitou-se a zona de pré-amplificação, foram utilizadas alíquotas de todos os reagentes para evitar a contaminação das soluções originais,
- em todos os procedimentos evitou-se a formação de aerossóis e salpicos,
- usaram-se micropipetas calibradas e reservadas para o procedimento da extracção e purificação de DNA assim como para amplificação por PCR,
- o DNA, mantido sempre a -20°C, foi o último a ser transferido para os tubos de reacção.

A técnica PCR (Reacção em cadeia pela enzima polimerase) foi descrita em meados da década de 80, por Mullis e colaboradores (Mullis & Faloona 1987) e cujo princípio se baseia na síntese de milhares de cópias de DNA *in vitro* catalisada por uma polimerase, habitualmente a *Taq* polimerase. Essa enzima, isolada da bactéria *Thermus aquaticus* que, por viver na natureza em fontes de água quente evoluiu para sobreviver em altas temperaturas, mantém-se estável depois de repetidas exposições a 94°C.

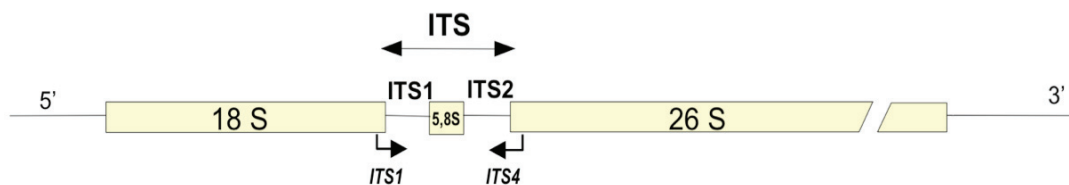
A obtenção de segmentos amplificados por PCR normalmente obedece às seguintes etapas: a) a extracção do DNA molde, que contém a região a ser amplificada, b) a escolha do segmento a ser amplificado e desenho e fabrico das sequências oligonucleotídicas específicas, ou *primers* específicos, para o reconhecimento desse segmento, c) a amplificação que dará origem a várias

cópias, fazendo-se uso de um termociclador e, por fim, d) a leitura do produto amplificado após electroforese com coloração.

Devido à sua especificidade e sensibilidade, a PCR é um método importante para o diagnóstico de um conjunto vasto de organismos, incluindo dos fungos. Existem vários exemplos de testes baseados em PCR desenvolvidos para a detecção de fungos em plantas, alimentos e em patologia médica.

A PCR pode ser utilizada para detectar grupos de linhagens, espécies ou mesmo taxa superiores consoante a região alvo escolhida é mais ou menos específica.

Para a detecção de um dado fungo em qualquer tipo de amostra é necessário a utilização de *primers* específicos que permitam a amplificação de um gene ou de um segmento específico daquela espécie ou daquela função que se deseja identificar. Assim, o desenvolvimento dos procedimentos de diagnóstico baseados em PCR requer o conhecimento das sequências nucleotídicas da região alvo, ou pelo menos dos seus extremos, de forma a se poder desenhar *primers* específicos. Neste sentido, algumas regiões, tais como aquelas que codificam o RNA ribossómico, têm sido bastante úteis. O DNA que codifica o RNA ribossómico apresenta-se como um cluster génico, no qual estão presentes as subunidades 18S, 5,8S e 28S (Figura 11). Estas subunidades são separadas por duas regiões denominadas ITS1 e ITS2 (*internal transcribed spacer*), as quais não são transcritas nem processadas quando se forma o RNA ribossómico maduro.



**Figura 11 - Representação esquemática da região ITS da unidade de DNA ribossómico. Abreviaturas: ITS1 e ITS2, espaçadores transcritos (Internal Transcribed Spacers); ITS1 e ITS4, primers universais para amplificação da região ITS.**

O facto desse cluster génico apresentar algumas regiões altamente conservadas, e outras variáveis, tem permitido a análise de variações em diferentes níveis taxonómicos.

As regiões ITS evoluem rapidamente sendo apropriadas para discriminar espécies relacionadas ou até mesmo variedades de uma mesma espécie.

O facto das regiões ITS serem flanqueadas por segmentos mais conservados, serem relativamente curtas (500 a 800pb) e aparecerem em grande número de cópias no genoma, permite que sejam amplificadas e sequenciadas com facilidade. Como consequência, é grande o número de sequências ITS actualmente disponíveis em bases de dados online, nomeadamente de numerosas espécies e estirpes de fungos patogénicos.

Para a amplificação por PCR da região ITS dos fungos que causam infecção, normalmente usa-se um par de *primers* universais que reconhece uma região altamente conservada do cluster génico que codifica RNA ribossómico e que flanqueia a própria região ITS. Assim, se a sequência alvo estiver presente, a reacção de PCR ocorre e o produto de amplificação do segmento referente às regiões ITS1, ITS2 e subunidade génica 5,8S do(s) fungo(s) será detectado posteriormente por electroforese, a partir de qualquer amostra que contenha biomassa fúngica.

### **2.5.1. Quantificação do DNA extraído**

Como a quantidade de DNA extraído a partir de cada amostra é muito variável, na medida em que é depende da quantidade de fungo existente nas unhas, foi então indicado proceder-se à quantificação do DNA logo após a extracção para se poder otimizar a reacção de amplificação por PCR.

Para tal foi utilizado o Nanodrop, um espectrofotómetro que utiliza somente 1 µl de amostra e efectua a medição da concentração da amostra desde 5 ng/µl até 3 000 ng/µl. Este dispositivo permite assim, a partir de uma porção muito pequena do produto da extracção, fazer a quantificação

do DNA existente e melhorar, de forma significativa, as taxas de sucesso da sequenciação. Na Figura 12 podemos observar a aplicação de uma amostra no Nanodrop para quantificação do DNA.



**Figura 12 - Aplicação da amostra no Nanodrop para quantificação do DNA existente.**

As amostras que apresentarem uma razão 260/280 entre 1,8 e 2,0 têm um grau de pureza elevado.

### **2.5.2. Amplificação da Região ITS do rDNA por PCR**

No presente trabalho foram utilizados os *primers* universais ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White *et al.* 1990) que, para além de amplificarem a regiões ITS1 e ITS2 a partir de DNA total extraído dos isolados fúngicos, amplificaram igualmente a subunidade 5,8S do cluster génico do rDNA (Figura 11). Após a amplificação, foi realizada a análise das sequências da referida região ITS de todos os isolados.

### **2.5.3. Reacção de PCR**

Em cada tubo de reacção de 0,2ml foram adicionados os seguintes reagentes para um volume final de 25µl, conforme consta na tabela 3.

**Tabela 3 - Reagentes da reacção de PCR**

	Concentração Final	Volume por reacção
Água bidestilada (Braun)		11,4µl
Tampão 10 X	1X	2,5µl
MgCl <sub>2</sub> 25mM	3,5mM	1,8µl
dNTPs (1,25mM cada)	250µl cada dNTP	2,5µl
Mistura dos <i>primers</i> [5 µM]	0,8µM para cada <i>primer</i>	0,8µl + 0,8µl
Taq polimerase	1U	0,2µl
DNA	Sem diluição	5µl

Para a amplificação das sequências foi utilizado o termociclador T Personal Biometra. O programa de PCR utilizado consistiu numa desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C, seguida de 35 ciclos de amplificação: desnaturação de 45s a 94°C, hibridação dos *primers* durante 30s a 54°C e extensão de 60s a 72°C, com uma extensão final de 5 minutos a 72°C.

#### 2.5.4. Visualização dos produtos de amplificação

O produto amplificado foi visualizado por electroforese em gel de agarose a 1,5% (50 ml de TBE 0,5%+ 0,75g de agarose Bioline<sup>®</sup>), corado com solução de Gel Red (+ 6 µl), utilizando como tampão de corrida TBE a 0,5%. Para a realização da electroforese foram adicionados 7µl de cada amostra resultante da amplificação do produto por PCR a 1 µl de solução de deposição.

O marcador de peso molecular foi GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus<sup>®</sup> (FERMENTAS). A electroforese decorreu a 50V durante 90 minutos num sistema de electroforese GEL XL Ultra V2<sup>®</sup>, Labnet.



O gel foi visualizado num transiluminador de raios ultravioleta e o registo fotográfico foi captado com o sistema UVIdoc (UviTec, Alfagene)<sup>®</sup>.

### **2.5.5. Purificação do DNA**

Neste trabalho o DNA amplificado foi purificado utilizando o kit comercial NucleoSpin<sup>®</sup>Extract II. Este método permite que o DNA, na presença do tampão de ligação (Buffer NT), se ligue a uma membrana de sílica após o que a mistura é colocada directamente numa coluna NucleoSpin<sup>®</sup>Extract II. A formula do tampão de ligação assegura a completa remoção dos *primers* em excesso, e simultaneamente, a ligação e purificação com elevado grau de recuperação dos fragmentos de DNA. Foram removidas contaminações com sais e componentes macromoleculares solúveis, utilizando um passo de lavagem com solução à base de etanol (Buffer NT3). O DNA purificado é eluido em condições de fraca força iónica com uma solução ligeiramente alcalina, Buffer NE (5 mM Tris/HCL, pH 8,5). O kit NucleoSpin<sup>®</sup>Extract II permitiu a purificação directa dos produtos de PCR.

As bandas foram visualizadas usando um transiluminador de UV e os fragmentos de DNA seccionados com um bisturi e retirados do gel para um tubo de 2 ml ao qual foi adicionado 200µl de Buffer NT.

A amostra foi incubada durante 5 a 10 minutos a 50°C. Em seguida, foi colocada no vortex de 2 em 2 minutos, até o fragmento do gel ficar totalmente dissolvido. Foi centrifugado durante 1 minuto a 11 000g e, após desprezar o excesso, foi novamente colocada na coluna NucleoSpin<sup>®</sup>Extract II no tubo de recolha.

Para realizar o passo de lavagem foi adicionado 700µl de Buffer NT3 na coluna NucleoSpin<sup>®</sup>Extract II. Procedeu-se à centrifugação durante 1 minuto a 11 000g.

O passo de secagem realizou-se com a centrifugação durante 2 minutos a 11 000g para remover o Buffer NT3. A recolha da amostra foi efectuada com a colocação de um novo tubo eppendorf de 1,5 ml na coluna NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II. Adicionou-se 15-50 µl Buffer NE e incubou-se à temperatura ambiente durante 1 minuto. Finalmente foi centrifugado durante 1 minuto a 11 000g para recolha do DNA purificado. As amostras de DNA purificadas foram guardadas a -20°C.

### **2.5.6. Sequenciação**

A determinação da sequência de nucleótidos que compõem um fragmento de DNA clonado representa um dos processos finais na análise de DNA. O método laboratorial mais comum de sequenciação de DNA é conhecido como o método de Sanger ou método de terminação de cadeias.

Este envolve novamente a síntese de cadeias simples de DNA, usando como molde a cadeia de DNA que se quer sequenciar. As cadeias sintetizadas são terminadas prematuramente nos vários tamanhos possíveis. A síntese começa sempre num ponto definido (por um *primer*) e termina por incorporação de nucleótidos terminadores. Estes são derivados didesoxi dos nucleótidos normais que, não possuindo um grupo hidroxilo na posição 3' da desoxirribose, impedem as ligações fosfodiéstericas do DNA. Consequentemente, termina a incorporação de nucleótidos à cadeia de DNA que está a ser sintetizada. Os quatro terminadores serão abreviadamente designados ddA, ddC, ddG e ddT. Hoje em dia, para que o DNA fique marcado utilizam-se compostos que emitem fluorescência a cores diferentes em cada um dos terminadores utilizados que depois são analisados em sequenciadores automáticos.

A função deste aparelho consiste em resolver as diferentes emissões que vão passando ao longo do tempo num detector a laser e interpretar assim a sequência de nucleótidos contida na amostra de DNA analisada.

## **RESULTADOS e DISCUSSÃO**

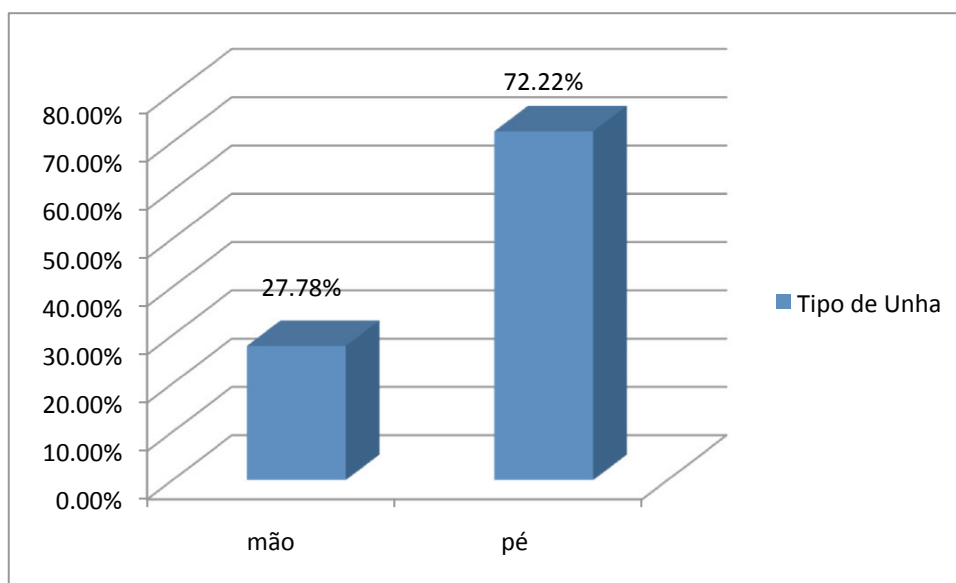
### 3.1. As Amostras Clínicas de Onicomicoses

Das 54 amostras incluídas neste trabalho, provenientes de lesões sugestivas de onicomicoses, 25,93% (14/54) pertenciam a indivíduos do sexo masculino e 74,07% (40/54) a indivíduos do sexo feminino. Estes resultados são corroborados pelos dados de outros autores, onde se observa regularmente uma predominância de onicomicoses em indivíduos do sexo feminino sobre os do sexo masculino, com valores de frequência entre 76% a 80% dos casos (Brilhante *et al.* 2005, Hilmioglu-Polat *et al.* 2005, Martins *et al.* 2007). Tais resultados diferem dos obtidos em Madrid (Perea *et al.* 2000) onde a prevalência foi maior em indivíduos do sexo masculino.

A idade dos indivíduos estudados variou entre os 10 anos de idade mínima, e os 74 anos de idade máxima. A idade média foi de 43,52 anos, com um desvio padrão de 15,25 tendo-se observado um coeficiente de variação maior de 0,3. Deste modo a mediana foi considerada a idade mais representativa nessa população, ou seja de 45,50 anos.

Relativamente ao local anatómico de origem, as amostras de unhas estudadas foram provenientes em 72,22% (39/54) dos casos de unhas dos pés e 27,78% (15/54) de unhas das mãos, como se pode verificar no gráfico 1. Resultados semelhantes foram relatados no Rio Grande do Sul (Lopes *et al.* 1999), em Barcelona (Madrenys-Brunet 1996), em Madrid (Perea *et al.* 2000) e em Londres (Midgley e Moore 1998).

Szepietowski *et al* (2006) já tinha referido que a onicomucose nas unhas dos pés era 4 a 7 vezes mais frequente do que nas unhas das mãos e têm sido indicados, como possíveis factores responsáveis por essa diferença, o crescimento mais lento da lâmina ungueal dos pés para além a maior probabilidade de trauma devido ao uso de calçado mais aberto (Araújo *et al.* 2003).



**Gráfico 1 - Distribuição das amostras por localização anatômica**

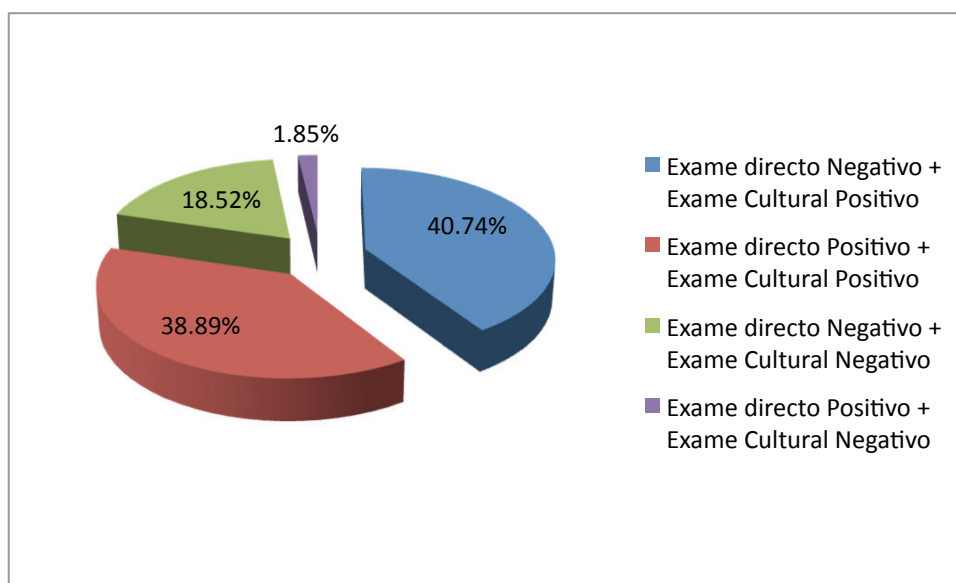
## **3.2. Diagnóstico Convencional das Infecções**

### **3.2.1. Exame Directo das Amostras**

Todas as amostras incluídas neste trabalho foram sujeitas ao diagnóstico laboratorial convencional que compreendeu o exame directo em KOH 20% e o isolamento e identificação do fungo causador da infecção a partir do estudo da morfologia das suas colónias.

Analisando os resultados do exame directo das amostras, 32 das amostras obtiveram resultado positivo no exame directo, sendo que 22 amostras obtiveram resultado negativo no exame directo.

Como se pode observar no gráfico 2, em relação à totalidade das amostras estudadas, 38,89% apresentaram resultado positivo tanto no exame directo como no exame cultural, e somente 18,52% das amostras apresentaram resultado negativo tanto no exame directo como na cultura.



**Gráfico 2 - Resultados do exame directo e cultural das amostras com suspeita de onicomicose.**

No entanto observou-se ainda a existência de uma percentagem de 40,74% das amostras com resultados negativos no exame directo mas com cultura positiva que se pode dever ao facto da quantidade de material seleccionada para a realização dos exames directos ser sempre inferior à que se retira para fazer a cultura.

Em situações habituais, somente se efectua uma lâmina de exame directo por cada amostra, enquanto para a cultura do fungo, se fazem três inóculos em cada tubo de ensaio e se inoculam pelo menos dois tubos de ensaio com meios de cultura diferentes, totalizando no mínimo seis inóculos. Justifica-se esta diferença porque a cultura é muito mais sensível e é a única que permite a identificação do fungo. Todavia não se deve negligenciar a realização do exame directo na medida em que é um exame de resposta muito rápida (em 30 minutos) que, mesmo não sendo tão sensível, ao permitir a constatação da presença de fungo nas amostras provenientes de infecções, possibilita a instituição da terapêutica mais atempadamente. O resultado a partir da cultura, mesmo sendo mais sensível, terá de esperar pelo menos três semanas a um mês.

Portanto, resultados negativos no exame directo e positivos no exame cultural podem estar relacionados com a menor sensibilidade do exame directo: havia à partida poucos elementos fúngicos na amostra e esta não foi convenientemente homogeneizada e, consequentemente, a quantidade de amostra retirada para o exame directo não continha elementos fúngicos.

Finalmente, 1,85% de amostras tiveram resultados positivos no exame directo mas foram negativas no exame cultural. Nas infecções fúngicas das unhas o fungo tem tendência para migrar no sentido da matriz ungueal e, assim que a atinge, equilibra a sua taxa de crescimento com a taxa de crescimento da própria unha, ficando praticamente restrito às zonas mais profundas da matriz. Mas, à medida que a unha cresce, os elementos fúngicos vão sendo empurrados para o exterior, sendo que os mais exteriores, já podem ser elementos fúngicos não viáveis, em que só permanecem as paredes celulares. São portanto fungos inviáveis que não irão crescer em cultura.

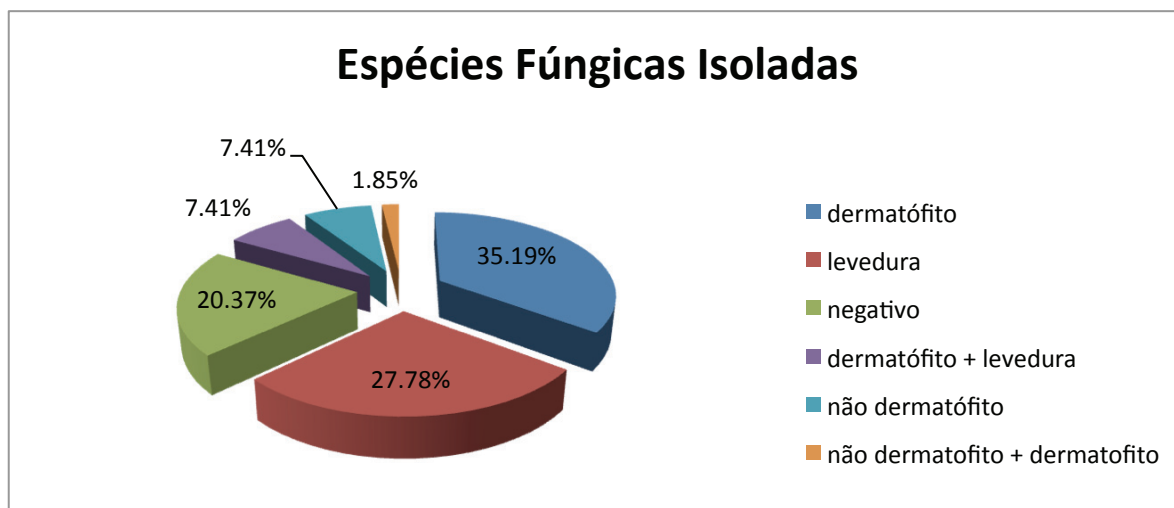
Assim, se na colheita de material ungueal o material for muito superficial e longe da própria matriz ungueal, existirá um forte risco de se observarem as paredes celulares inertes dos cadáveres de fungo no exame directo, sem que se desenvolva qualquer colónia fúngica em cultura. Por vezes as culturas podem ser igualmente negativas devido ao fio recto estar demasiado quente na altura da inoculação, queimando a amostra. E isto pode acontecer quando há um grande volume de amostras para ser processado num curto intervalo de tempo.

### **3.2.2. Isolamento e Identificação dos Fungos em Cultura**

Para todas as amostras que deram origem ao crescimento de colónias em cultura foi possível identificar a espécie do fungo causador da infecção através da observação das suas características macroscópicas e microscópicas.

Em relação à etiologia das onicomicoses estudadas neste trabalho, os grupos de fungos isolados foram: 35,19% dermatófitos, 27,78% leveduras e 7,41% de fungos filamentosos não dermatófitos.

Em 9,26% dos casos estudados observou-se a existência de infecções mistas (dermatófito + não dermatófito ou dermatófito + levedura) e em 20,37% dos casos a cultura foi negativa (gráfico 3).

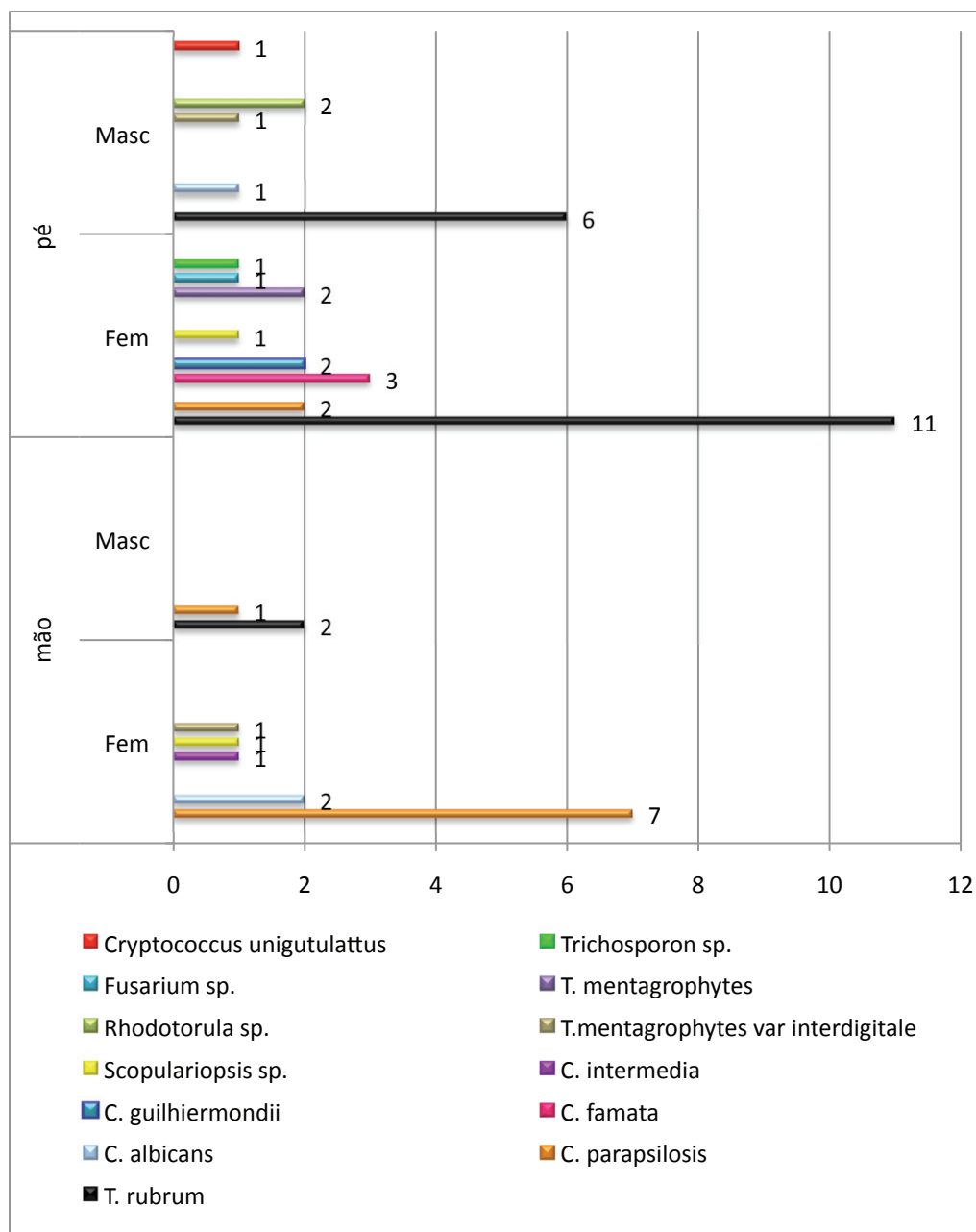


**Gráfico 3 - Etiologia das onicomicoses com base nos resultados obtidos na cultura das amostras estudadas neste trabalho.**

Relativamente às espécies de dermatófitos identificadas (gráfico 4), a espécie mais isolada foi *T. rubrum* (19/54) seguido do *T. mentagrophytes* (4/54). Relativamente às leveduras isoladas a mais frequente foi a *Candida parapsilosis* (10/54), seguida de *C. albicans* (3/54) e *C. famata* (3/54). Os fungos filamentosos não dermatófitos isolados a partir das amostras estudadas pertenceram somente a dois géneros: *Scopulariopsis* sp. (2/54) *Fusarium* sp. (1/54).

Foram também identificados outras leveduras pertencentes ao género *Rhodotorula* sp., *Trichosporon* sp. e em uma amostra foi identificado o *Cryptococcus unigutulattus*.

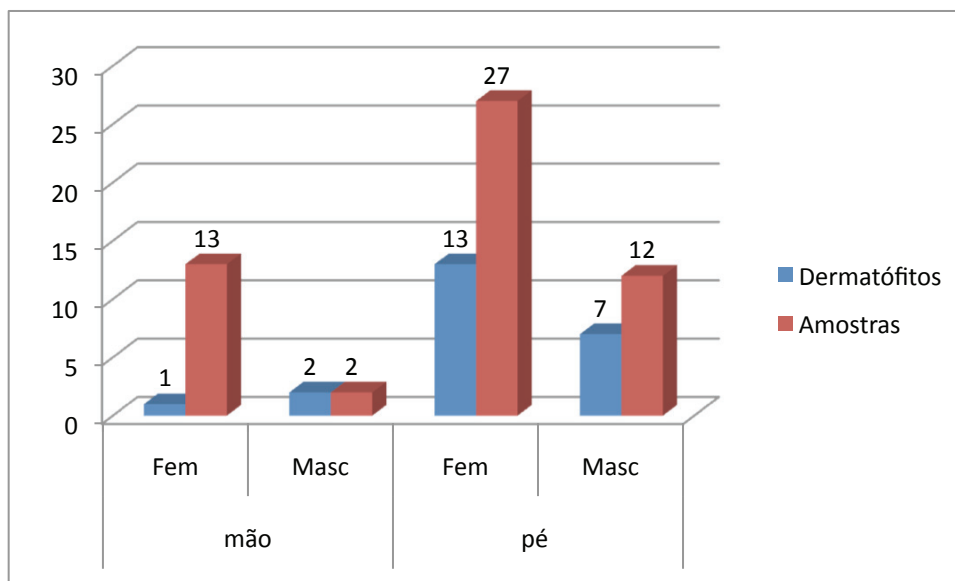




**Gráfico 4 - - Distribuição de todos os agentes causadores de onicomicose nas amostras estudadas**

Relativamente à frequência de isolamento de fungos dermatófitos por sexo e localização anatômica, (gráfico 5) verificou-se que das 27 amostras provenientes das unhas dos pés de indivíduos do sexo feminino, 13 foram positivas para dermatófitos, o que corresponde a uma percentagem de 56,52%

em 86,96% e, das 12 amostras provenientes do pé de indivíduos do sexo masculino, 7 foram positivas a dermatófitos, originando uma percentagem de 30,43% em 86,96%.



**Gráfico 5 - Frequência de isolamento de dermatófitos partir das onicomicoses estudadas neste trabalho por sexo e por localização anatômica dos doentes.**

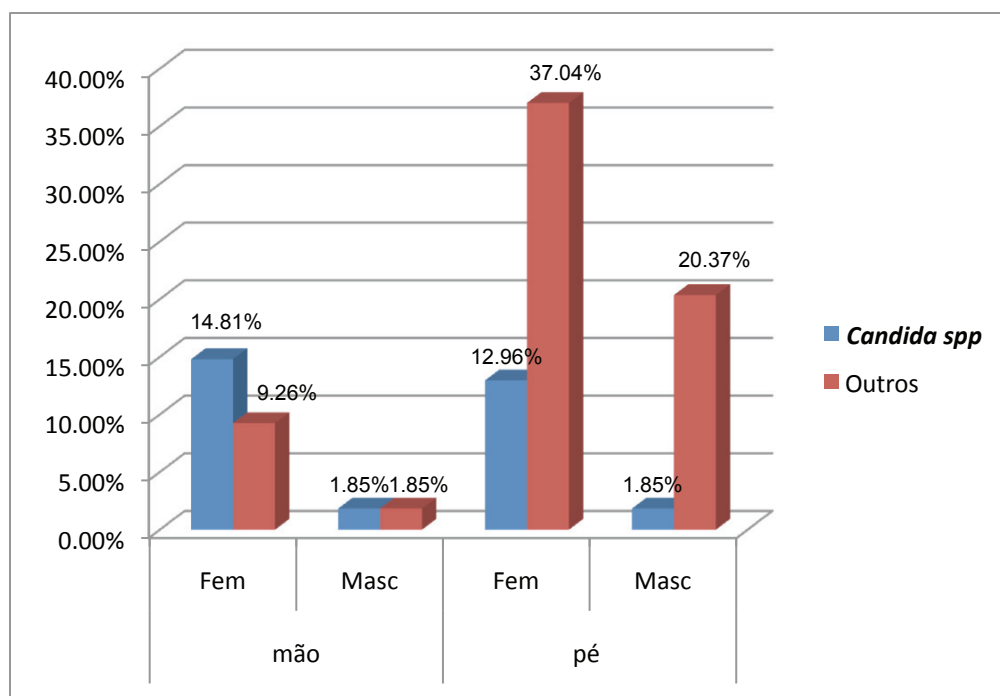
Estes resultados divergem parcialmente dos estudos realizados por outros autores onde os dermatófitos são mais isolados nas unhas dos pés e predominam no sexo masculino (Kemna & Elewski 1996, Madrenys-Brunet 1996, Luque *et al.* 1997, Midgley & Moore 1998, Lopes *et al.* 1999).

Neste trabalho, *T. rubrum* foi o dermatófito mais abundante (19/54) e o mais isolado a partir das unhas dos pés (17/20) e estes resultados são semelhantes aos obtidos em Barcelona (Madrenys-Brunet 1996), Rosário na Argentina (Luque *et al.* 1997), Itália (Mercantini *et al.* 1996), Londres (Midgley & Moore 1998), Córdoba (Velez *et al.* 1997), Estados Unidos (Kemna & Elewski 1996) e Rio Grande do Sul (Lopes *et al.* 1999).

Na Ásia, o projecto Achilles também evidenciou a prevalência dos dermatófitos tendo sido *T. rubrum* o mais isolado, seguido de *T. mentagrophytes* (Burzykowski *et al.* 2003). A maior frequência deste

dermatófito antropofílico pode estar relacionado com o processo de globalização, fomentando a formação de aglomerados populacionais, propiciando a disseminação deste fundo dermatófito. Esta espécie antropofílica é conhecida pela sua adaptação ao tecido humano queratinizado, o que pode ser notado pela necessidade de um maior tempo de tratamento para obter a cura quando comparado a infecções causadas por dermatófitos zoofilicos e geofilicos.

Em relação às infecções das unhas causadas por leveduras (gráfico 6), observou-se uma maior incidência de infecções nas mulheres por espécies do género *Candida* tanto nas unhas das mãos (14,81%) como nas dos pés (12,96%). Já nos homens as infecções por estes fungos corresponderam a 1,85% dos casos tanto nas unhas das mãos como nas dos pés.

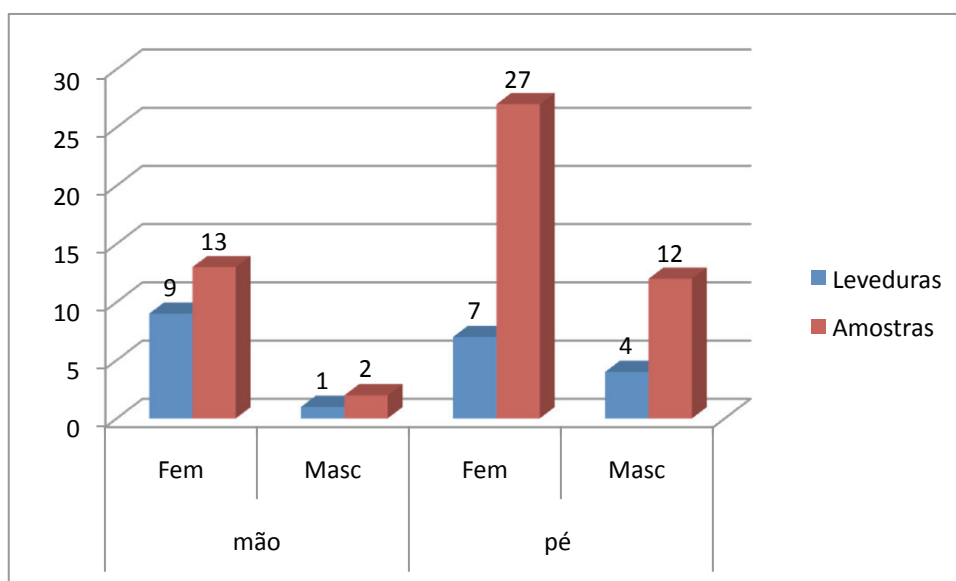


**Gráfico 6 - Frequência de isolamento de *Candida* sp. a partir das onicomicoses estudadas neste trabalho por sexo e por localização anatômica dos doentes.**

Analisando o gráfico 7, podemos observar que a incidência de infecção por leveduras é superior nos indivíduos do sexo feminino independentemente da localização anatômica. Das 13 amostras

provenientes da mão de indivíduos do sexo feminino, 9 foram positivas para leveduras, o que corresponde a uma percentagem de 42,86% (num total de 47,62% amostras). Nas duas amostras provenientes da mão de indivíduos do sexo masculino, apenas uma foi positiva para levedura.

Quando falamos das unhas dos pés, a incidência de onicomicoses causadas por leveduras diminui, pois em 27 amostras provenientes de indivíduos do sexo feminino apenas 7 foram positivas para leveduras e no sexo masculino, das 12 amostras estudadas em apenas 4 o agente causal foi uma levedura.



**Gráfico 7 - Frequência de isolamento de leveduras a partir das onicomicoses estudadas neste trabalho por sexo e por localização anatômica dos doentes**

Os resultados obtidos neste trabalho relativamente às infecções por leveduras não divergem muito daqueles obtidos por outros autores em outros estudos realizados em Barcelona (Madrenys-Brunet 1996), Rosário na Argentina (Luque *et al.* 1997), Itália (Mercantini *et al.* 1996), Londres (Midgley & Moore 1998), Córdoba (Velez *et al.* 1997), Estados Unidos (Kemna & Elewski 1996) e Rio Grande do Sul (Lopes *et al.* 1999) em que se isolaram predominantemente infecções nas unhas das mãos em indivíduos do sexo feminino.

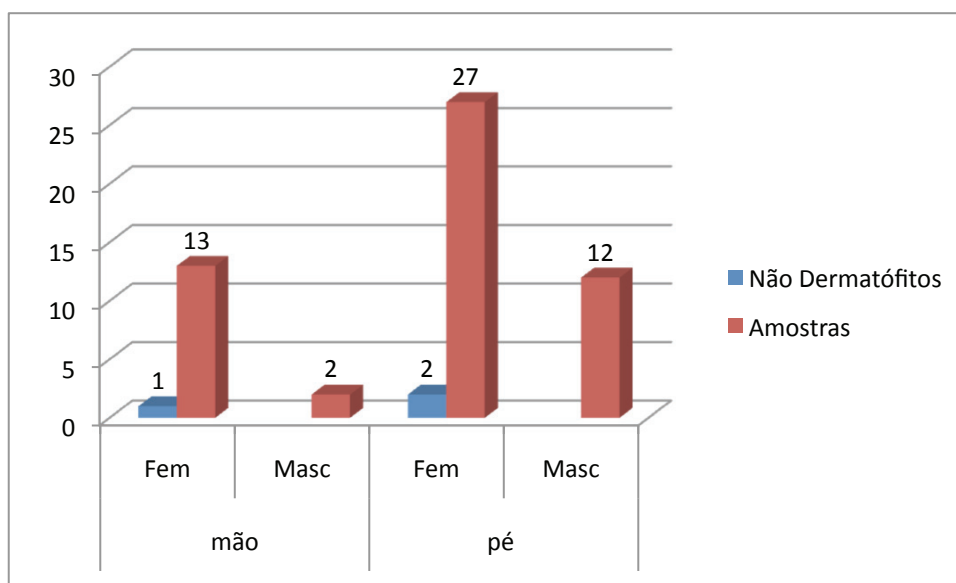
Pensa-se que a maior susceptibilidade das mulheres às infecções ungueais por leveduras possa ser explicada por estas executarem determinados trabalhos ou certas actividades de risco, como por exemplo, trabalhos em indústrias conserveiras ou mesmo domésticos, em que as mãos permanecem húmidas ou mesmo molhadas durante longos períodos de tempo ou mesmo dentro de luvas de borracha.

Por outro lado, mas simultaneamente, o contacto com substâncias químicas, como detergentes e abrasivos, podem fragilizar a superfície cutânea e diminuir as defesas locais favorecendo o aparecimento de candidose cutânea e/ou ungueal. Em muitos casos estas infecções podem ser consideradas micoses ocupacionais, devido à estreita relação com as referidas actividades e à sua elevada frequência.

Observando o gráfico 8, podemos verificar que das 13 amostras provenientes das unhas das mãos de indivíduos do sexo feminino, em apenas um foi identificado um fungo filamentoso não dermatófito (FND), e das 27 amostras de unhas do pé de indivíduos do sexo feminino apenas duas foram positivas para FND. Não houve qualquer resultado positivo em indivíduos do sexo masculino.

Tal como já foi referido o *Scopulariopsis* sp. foi fungo filamentoso não dermatófito mais isolado (2/54) pelos métodos convencionais de diagnóstico com um caso nas unhas das mãos e um caso nas unhas dos pés. Só existiu um caso de isolamento do género *Fusarium* sp. (1/54) com localização na unha do pé de um indivíduo do sexo feminino.

Em outras regiões do globo a ocorrência e a frequência das espécies de FND também é variável. Nos estudos realizados em Espanha e Itália, *Scopulariopsis brevicaulis* foi o agente dominante, em relação aos outros fungos filamentosos não dermatófitos, com frequências de 7,8 e 35%, respectivamente.



**Gráfico 8 - Frequência de isolamento de fungo filamentosso não dermatófito partir das onicomicoses estudadas neste trabalho por sexo e por localização anatômica dos doentes**

Noutros estudos realizados nos Estados Unidos, o género *Fusarium* sp. foi reportado como o agente etiológico mais frequente de onicomicose dentre os fungos filamentosos não dermatófitos, atingindo a frequência de 34,1% (Hilmioglu-Polat *et al.*, 2005).

Segundo um estudo realizado no Ceará, Brasil (Brilhante *et al.*, 2005), *Fusarium* sp. foi o fungo filamentosso não dermatófito mais isolado, com uma frequência de 8,19%.

Neste trabalho, o número de infecções mistas foi relativamente elevado (6/54), tendo-se verificado a ocorrência de infecções causadas simultaneamente por um dermatófito e uma levedura em 4 casos, sendo 1,85% por *T. rubrum*+*C. guilliermondii*, 1,85% por *T. rubrum*+*C. parapsilosis*, 1,85% por *Rhodotorula* sp.+*T. rubrum* e 1,85% por *T. rubrum*+*Cryptococcus* sp. e por duas leveduras em simultâneo em 2 casos, sendo 1,85% por *C. parapsilosis*+*C. intermédia* e 1,85% por *C. guilliermondii*+*Trichosporon* sp.

As culturas mistas encontradas podem na realidade ter correspondido tanto a infecções mistas, ou seja, infecções causadas conjuntamente por ambos os fungos, como tendo sido iniciadas somente por um deles com posterior colonização do tecido ungueal pela outra espécie. Quando ocorre uma

infecção fúngica, os tecidos ficam de tal forma fragilizados que permitem a entrada de outros microrganismos que, mesmo não sendo responsáveis por infecção, passam a colonizar o local afectado. E esta situação ocorre naturalmente em muitas infecções, tanto com outras espécies fúngicas, como com bactérias, vírus ou outros microrganismos.

No entanto, a questão da distinção entre infecção mista ou colonização de um dos isolados será sempre difícil de responder e transcende o âmbito deste trabalho.

Comparando todos resultados obtidos neste trabalho no isolamento de fungos com resultados os existentes da literatura verificamos que são, de certa forma, bastante concordantes. Os outros autores têm igualmente observado que os dermatófitos são os maiores responsáveis por onicomicoses, representando cerca de 69 a 80% dessas infecções (Gupta & Lynde 1997a, López & Torres 1999a, Ghannoum *et al.* 2000, Gupta & Hem 2000).

No entanto, num trabalho realizado em Fortaleza, no nordeste brasileiro (Martelozzo *et al.* 2005), encontraram proporções diferentes das dos autores acima citados, com valores superiores para o isolamento de leveduras, 52,17%, e somente 33,85% para dermatófitos e 13,97% para fungos filamentosos não dermatófitos.

O Projecto Achilles foi o maior estudo de prevalência das doenças dos pés realizado na Europa até ao momento e, através dele, ficou demonstrado que as onicomicoses são muito mais comuns do que se imaginava anteriormente (Burzykowski *et al.* 2003). A descrição de novas espécies fúngicas que provocam onicomicoses é uma realidade muito pouco descrita. Para alterar esta percepção é necessário um diagnóstico preciso, com metodologias de estudo correctas e padronizadas, publicação de estudos relatando os resultados obtidos, daí a importância de realizar estudos experimentais.

### **3.3. Identificação Molecular dos Fungos causadores de Onicomicose**

#### **3.3.1. Extracção directa de DNA Fúngico a Partir de Unhas Infectadas**

Terminado o procedimento de extracção DNA directamente das mostras de unhas descrito no ponto 2.4.1. do capítulo materiais e métodos, foi necessário verificar se existia DNA. Após a quantificação do DNA recorrendo ao Nanodrop (Anexo 2, Tabela 6), verificámos que todas as amostras possuíam DNA.

Foi fundamental proceder à quantificação do DNA existente em cada uma das amostras para saber a melhor concentração de DNA a ser posteriormente utilizada na reacção de PCR. Esta quantificação foi feita em duplicado e foi calculado o valor médio para cada uma das amostras estudadas. No Anexo 2, tabela 6 podemos ver os valores obtidos após a quantificação do DNA de cada uma das amostras estudadas utilizando o Nanodrop, utilizando a razão 260/280, bem como a sua qualidade e grau de pureza. Foi igualmente avaliado o grau de pureza de todas as extracções para se verificar a possível presença de contaminantes, tais como etanol utilizado num dos passos realizados com o QuickGene DNA Tissue kit S.

Para determinar qual o volume adequado de amostra para se obter amplificação por PCR foram realizadas várias experiências, e concluiu-se que 5 µl de DNA eram suficientes.

#### **3.3.2. Amplificação da Região ITS do rDNA por PCR**

Com todos os produtos obtidos na extracção do DNA directamente das de unhas com infecção foi feita a amplificação por PCR a região ITS do DNA ribossómico de todas as amostras, conforme as condições descritas na tabela 3 (página 59). Os resultados obtidos após a corrida em gel de



electroforese estão representados no Anexo 3, Figuras 17 a 21. Cada amostra foi referenciada em função dos resultados anteriormente obtidos diagnóstico convencional, conforme estão apresentados no anexo 2, tabela 6.

De todas as amostras estudadas que tinham tido resultado positivo na cultura do diagnóstico convencional, apenas com as amostras 7, 27, 28, 35 e 37 não foi possível obter amplificação da região ITS. No caso da amostra 13, como se observou uma banda ténue de cerca de 700 pares de bases após a amplificação do primeiro produto de extracção, foi repetida a extracção de DNA e obteve-se um resultado positivo tendo-lhe sido atribuída uma nova identificação (número 57). Relativamente às restantes amostras positivas na cultura mas negativas na amplificação, não foi possível repetir o processo de extracção porque o material clínico já tinha sido completamente gasto na primeira e única extracção. É muito provável que nestes casos a quantidade de elementos fúngicos na amostra clínica fosse tão diminuta que, posteriormente, amplificação não se tornasse visível num gel de electroforese.

As amostras 17, 23, 48, 49, 53 e 54 apresentaram resultado negativo tanto no exame directo como no exame cultural do diagnóstico convencional bem como após a amplificação por PCR da região ITS. Na quantificação do DNA destas amostras com o Nanodrop obtivemos valores residuais. Verificámos deste modo total concordância entre os resultados do diagnóstico convencional e molecular.

As amostras 41, 42, 44, 45 e 46 apresentam resultado negativo tanto no exame directo como no exame cultural. No entanto, na amplificação das regiões ITS e na quantificação do DNA obtido, apresentaram não só resultados positivos como os valores da quantificação se revelaram significativos. Provavelmente estaríamos na presença de um ou mais agentes fúngicos, que se encontravam em baixa concentração e, talvez por isso, não tenham sido observados em exame

directo nem crescido em cultura. Nestes casos, seria interessante repetir a extracção de DNA, caso ainda existisse produto.

Ao observarmos as diferentes imagens dos géis (Anexo 3, Figuras 17 a 21) verificamos a existência de mais do que uma banda ou fragmento amplificado em muitas das amostras, alguns com tamanhos diferentes como por exemplo as amostras 9, 20, 58 ou 59, ou então com dimensões tão próximas, que geraram bandas muito espessas (1,8, 11,26, 29, 34, 38 e 40).

Este aparecimento de mais que um fragmento para uma mesma amostra ocasionou o levantamento de algumas dúvidas sobre a origem dos mesmos. Uma dessas dúvidas foi a possibilidade da existência de vários fungos presentes numa mesma amostra. Tal possibilidade poderia ser bastante plausível, uma vez que as unhas podem ser colonizadas simultaneamente por vários agentes fúngicos. Uma outra possibilidade seria a contaminação com DNA humano, caso os primers ITS1 e ITS4 não fossem específicos para fungos e também pudessem amplificar DNA humano. Para responder a estas questões, resolvemos fazer a análise das sequências da região ITS das duas bandas em separado de algumas destas amostras.

Para melhor separar os vários fragmentos das amostras escolhidas, considerando que o seu tamanho era muito próximo, pois diferiam em cerca de 100 pb, foi repetida a electroforese em gel de agarose, mas desta vez com uma concentração de 2 % de agarose (50 ml de TBE 0,5%+ 1 g de agarose). A malha do gel, sendo mais apertada, e a corrida feita lentamente e durante mais tempo (a 50V durante 120 minutos) iria ajudar a clarificar melhor as bandas, uma em relação à outra. Posteriormente confirmámos que este processo permitiu uma melhor separação dos diferentes fragmentos de cada amostra.

Seguidamente cada fragmento foi excisado do gel e só então se procedeu à purificação dos mesmos, conforme já foi descrito em 2.5.5. do Capítulo Materiais e Métodos, passo prévio essencial antes do seu envio das amostras para a sequenciação. Este passo é muito importante, deve ser sempre

realizado antes de qualquer sequenciação, porque vai remover todos os restos de produtos utilizados na PCR que não foram consumidos. Sem este procedimento não será possível obter resultados satisfatórios e confiáveis.

### **3.3.3. Sequenciação da região ITS e identificação dos fungos infectantes**

Das amostras que apresentaram resultados positivos no diagnóstico convencional com nas quais obtivemos também resultados positivos nos géis acima descritos, foram seleccionados 25 fragmentos de DNA com a região ITS já amplificada. Algumas das amostras clínicas com mais do que uma banda foram seleccionados os diferentes fragmentos em separado, aos quais demos o número da amostra seguido das letras A, B ou MA.

Por exemplo, com a amostra número 1, obtivemos três bandas diferentes, com diferentes tamanhos após a amplificação da região ITS do rDNA: 1 (600pb); 1A (500pb) e 1B (400bp). Na amostra 18, obtivemos também três bandas diferentes: 18 (600pb); 18A (650pb) e 18MA (700pb). Após purificação só foi possível enviar para a sequenciação dois dos três fragmentos, pois sendo bandas muito próximas e com uma quantificação baixa, corremos o risco de haver perda de material aquando da excisão das bandas do gel de agarose. A mesma situação ocorreu com as bandas 16A (700pb), 30A (400pb) e 31A (400pb).

No Anexo 4, Figuras 22 a 24, podemos observar que, após a purificação, a maioria das amostras possuíam produto suficiente para serem enviadas para sequenciação (números a verde). Quanto às restantes amostras, (números a vermelho) a quantidade de produto obtido foi de tal insuficiente que não foi possível visualizar bandas amplificadas no gel de electroforese.

Para incluir estas amostras neste estudo, seria necessário repetir o processo de purificação a fim de se obter uma maior concentração de produto amplificado mas, devido ao prazo reservado à elaboração

da dissertação já estar a terminar, não foi possível fazê-lo, pelo que essas amostras não foram sequenciadas.

Em seguida todos os produtos de PCR purificados foram enviados para a empresa MACROGEN<sup>®</sup>, na Coreia, a fim de serem determinadas as suas sequências nucleotídicas. A escolha desta empresa baseou-se no conhecimento antecipado da sua vasta experiência e rigor dos seus resultados, qualidades essas que, com as amostras difíceis deste trabalho, ficou comprovada.

Com as amostras 2, 4, 11, 14, 15, 16A, 18A, 21, 30A e 31A, após o processo de excisão das bandas do gel de agarose, e subsequente purificação, não foram observadas bandas. Deste modo, estas amostras não puderam ser enviadas para a sequenciação da região ITS do rDNA.

Recebidos os resultados obtidos após a sequenciação da região ITS do rDNA, procedeu-se à análise das sequências e em seguida ao alinhamento das mesmas com sequências depositadas em bases de dados públicas, como por exemplo do Gene Bank, para identificação das mesmas (Tabela 4).

Através dessa análise ficou provada a inexistência de DNA humano entre as nossas amostras e assim pudemos inferir que os primers ITS1 e ITS4 são realmente específicos para fungos. Todas as bandas isoladas para as quais foram determinadas as sequências revelaram ser de DNA fúngico.

**Tabela 4 – Resultados da identificação das amostras enviadas para sequenciação da região ITS do rDNA a partir de DNA isolado directamente de unhas com infecção.**

Número da Amostra	Fragm. analisado ITS1/ITS4 (pb)	Identificação por Sequenciação	% de confiança na identificação
1	557/564	Uncultured soil fungus	98
1A	517/520	<i>Filobasidiella neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	99
10	158/191 39/42	Fungal endophyte sp. <i>Candida</i> sp.	82 92
18	258/281 80/92	<i>Eurotium rubrum</i> Uncultured soil fungus	91 86
24	556/589	<i>Candida parapsilosis</i>	94
26	467/480	<i>Candida parapsilosis</i>	97
20	495/464	<i>Candida albicans</i>	99
30	507/507	<i>Filobasidiella neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	100
31	517/517	<i>Filobasidiella neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	100
6	262/313	<i>Candida parapsilosis</i>	83
8	367/391	<i>Candida parapsilosis</i>	93
22	388/348	<i>Candida albicans</i>	89

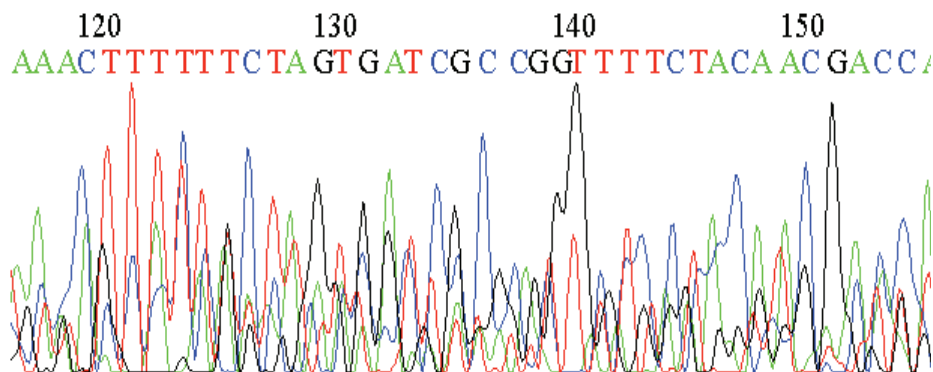
Com algumas das amostras enviadas para sequenciação, como por exemplo com as amostras 3, 5, 9, 19, 16, 25 e 29 não foi possível obter uma identificação de um agente fúngico, provavelmente devido a poder existir uma mistura de vários fragmentos de DNA fúngico numa mesma amostra.

É do conhecimento comum que as unhas não são amostras esterilizadas e que, quando se encontram no doente, estão muito contaminadas com outros microrganismos, quanto mais não seja, na sua superfície.

Contudo, neste trabalho, a contaminação superficial da unha por microrganismos foi eliminada durante o processo de tratamento das amostras anterior à extracção do DNA, através da utilização da lavagem vigorosa com Etanol a 100% e posteriormente com água destilada. O que realmente deve ter sucedido, é que em unhas infectadas há uma forte possibilidade de co-existir mais do que um agente fúngico no interior da mesma amostra clínica sendo que, provavelmente, um deles invadiu inicialmente o tecido ungueal lesionando-o e fragilizando-o e o(s) outro(s), aproveitando a diminuição da integridade do tecido, com facilidade o colonizam. E, na separação electroforética das regiões ITS do rDNA dos diferentes organismos co-existent na amostra, se todos os fragmentos amplificados tiverem dimensões muito semelhantes, não será possível detectar a existência de sequências diferentes.

Esta situação pode ser, deste modo, uma explicação para o facto de se terem obtido neste trabalho alguns resultados da sequenciação de tal forma confusos que impediram a identificação de uma só espécie na amostra de DNA enviada. Este é, por exemplo, um problema que já não se põe quando se faz a extracção de DNA a partir de microrganismos isolados a partir de culturas puras em que à partida está garantida a existência de um único microrganismo.

Para ilustrar os resultados obtidos com estas amostras mistas, na Figura 13 podemos observar a existência de mais do que um pico para cada nucleótido. Se a amostra estivesse pura, existiria um único pico em cada nucleótido mas vários picos simultâneos significam a existência simultânea de fragmentos de DNA com sequências diferentes, ou seja, uma amostra com mistura de, neste caso, mais do que um fungo.



**Figura 13 - Fragmento do gráfico resultante da determinação da sequência nucleotídica da região ITS do rDNA da amostra 19 em que se pode observar que para o mesmo nucleótido existe frequentemente mais do que um pico do gráfico significando uma mistura de dois ou mais DNAs de organismos diferentes na mesma amostra.**

Esta observação veio a confirmar a forte possibilidade das unhas poderem possuir, em simultâneo, mais do que um agente fúngico ser encontrados sendo que alguns grupos de doentes em que as unhas se encontrem mais fragilizadas (doentes imunocomprometidos, diabéticos ou após traumatismos nas unhas), mesmo os fungos habitualmente contaminantes ou saprófitas poderem agir como agentes causadores de doença. Resultados semelhantes foram obtidos nas restantes amostras.

Com a amostra 1, o fragmento amplificado e purificado enviado para sequenciação tinha 643 bases mas o fragmento estudado, onde foi possível fazer um alinhamento que nos levou a uma identificação, tinha somente 564 bases. Desta sequência de bases, 557 bases levaram-nos à identificação “Uncultured soil fungus” com uma percentagem de confiança de 98%.

Com o fragmento da amostra 1A foi possível alinhar 520 bases das quais 517 bases corresponderam à identificação da levedura *Filobasidiella neoformans* var. *neoformans* com uma percentagem de confiança de 99%.

Com a amostra 10, só foi feito o alinhamento de uma pequena parte do fragmento total de 522 bases, ou seja apenas somente 42bases das quais 39 bases corresponderam *Candida* sp. com uma percentagem de confiança de 92%. No mesmo fragmento estudado, onde foi possível fazer o alinhamento de outra região com 191 bases obteve-se outra identificação a partir de 158 bases, as quais corresponderam um fungo endofítico com uma percentagem de confiança de 82%. No entanto, no diagnóstico convencional da mesma amostra tinha sido identificado *Candida parapsilosis*. Neste caso existiu portanto uma forte suspeita de uma infecção mista.

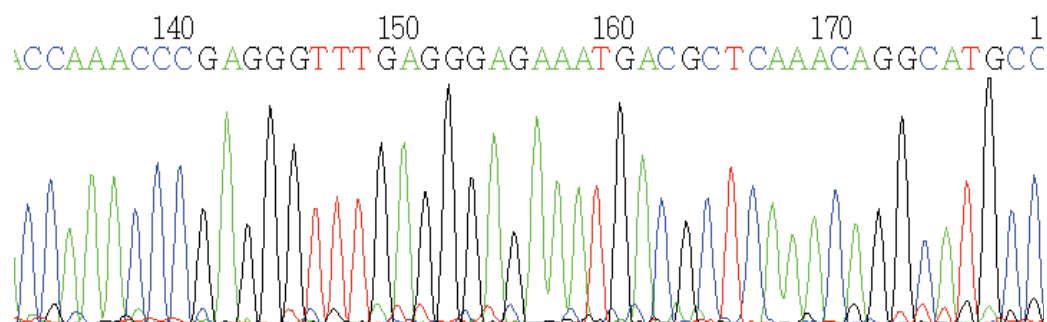
Na identificação molecular da amostra 18 a análise das sequências obtidas permitiu um alinhamento parcial de 281 bases do fragmento total com 513 bases. daquelas, 258 bases alinharam com a sequência nucleotídica de um fungo (*Eurotium rubrum*), com uma percentagem de confiança de 91%. No mesmo fragmento, foi possível a partir de uma outra sequência nucleotídica obter a identificação de um “Uncultured soil fungus” a partir do alinhamento de 80 bases tendo obtido uma percentagem de confiança de 86%. No diagnóstico convencional desta amostra tina sido identificado o fungo *Trichophyton mentagrophytes*.

Com outras amostras (20, 24 e 26), em contrapartida, foi possível confirmar através da sequenciação a presença da mesma espécie fúngica já identificada por métodos convencionais.

Nas figuras 14 e 15, apresentamos fragmentos de dois exemplos em que foi identificado *Candida parapsilosis*, como agente fúngico causador de doença, com uma elevada percentagem de confiança. Nestes casos a sequência obtida permitiu obter um gráfico muito claro, sem que mostrasse sobreposição de picos, e os resultados corroboraram os anteriormente obtidos pelos métodos convencionais de diagnóstico.

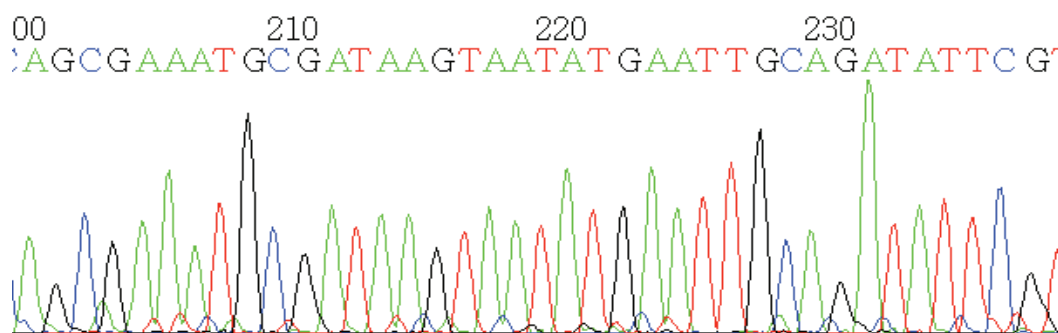
Na identificação molecular da amostra 24, as 556 bases consensuais em 589 bases alinhadas permitiram a identificação de *Candida parapsilosis* (percentagem de confiança de 94%).





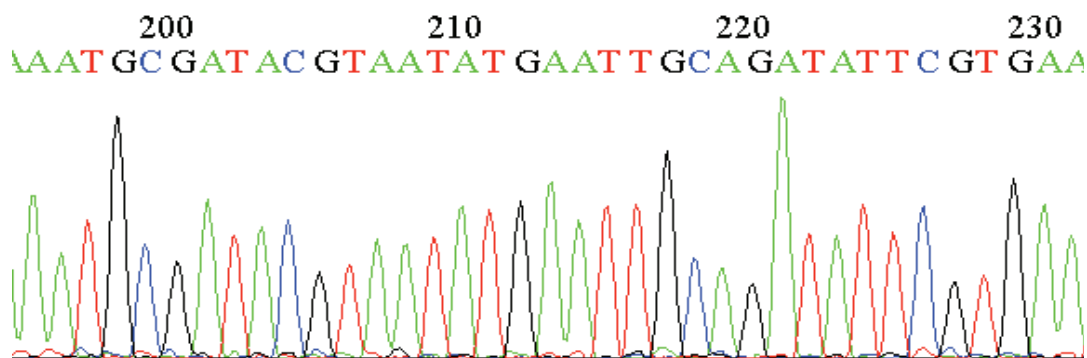
**Figura 14 - Fragmento do gráfico resultante da determinação da sequência nucleotídica da região ITS do rDNA da amostra 24 em que se pode observar que para cada nucleótido existe um único pico do gráfico que permitiu a identificação de *C. parapsilosis* com 94% de confiança.**

Na identificação molecular da amostra 26, o fragmento total o fragmento enviado para sequenciar tinha 515 bases, aquele que foi alinhado tinha 480 bases e destas, 467bases foram consensuais à sequência depositada na base de dados correspondente à levedura *Candida parapsilosis* (percentagem de confiança de 97%).



**Figura 15 - Fragmento do gráfico resultante da determinação da sequência nucleotídica da região ITS do rDNA da amostra 26 em que se pode observar que para cada nucleótido existe um único pico do gráfico que permitiu a identificação de *C. parapsilosis* com 97% de confiança.**

Na Figura 16, temos um outro exemplo em que foi identificado como agente etiológico da infecção a levedura *Candida albicans*. Neste caso tivemos igualmente uma sequência limpa, sem sobreposição de picos, e o resultado obtido a partir da análise das sequências corroborou o resultado do método convencional de diagnóstico a partir da cultura do fungo. Na identificação molecular desta amostra 20, o fragmento inicial tinha 539 bases, mas o fragmento estudado tinha 495 bases, das quais 494 bases corresponderam ao agente *Candida albicans* com uma percentagem de confiança de 99%.



**Figura 16 - Fragmento do gráfico resultante da determinação da sequência nucleotídica da região ITS do rDNA da amostra 20 em que se pode observar que para cada nucleótido existe um único pico do gráfico que permitiu a identificação de *C. albicans* com 99% de confiança.**

As amostras 30 e 31 foram identificadas através da análise das sequências como sendo o agente causador de doença *Filobasidiella neoformans* var. *neoformans*. Contudo este resultado é completamente divergente do obtido pelo diagnóstico convencional.

Na verdade, na identificação molecular da amostra 30 o fragmento inicial tinha 591 bases e o fragmento estudado 507 bases, todas elas consensuais à sequência depositada na base de dados de *Filobasidiella neoformans* var. *neoformans* (percentagem de confiança de 100%), valores de

consenso para identificação muito elevados, apesar de no diagnóstico convencional ter sido identificado *T. rubrum* nesta amostra.

Na amostra 31, o fragmento inicial tinha 602 bases, o fragmento estudado tinha 517 bases e todas elas foram consensuais à sequência depositada na base de dados de *Filobasidiella neoformans* var. *neoformans* (percentagem de confiança de 100%), mas no diagnóstico convencional esta amostra 31 tinha sido negativa.

Pensamos que nestes dois casos ou pode ter ocorrido um erro no diagnóstico convencional, embora não seja fácil confundir um fungo filamentoso (*T. rubrum*) com um fungo leveduriforme (*Filobasidiella neoformans* var. *neoformans*) ou então que tenha ocorrido uma contaminação em algum momento do processo.

Nas amostras 6 e 8 foram identificadas através da sequenciação a presença da levedura *Candida parapsilosis* e mais uma vez o resultado foi divergente do obtido pelo diagnóstico convencional.

Na identificação molecular da amostra 6, em que o fragmento inicial tinha 480pb, o fragmento estudado tinha 313pb, somente 262pb corresponderam a uma sequência depositada de *Candida parapsilosis* (percentagem de confiança de 83%).

Na identificação molecular da amostra 8, o fragmento inicial tinha 485pb, o fragmento estudado tinha 391pb das quais 367pb permitiram a identificação de *Candida parapsilosis* (percentagem de confiança de 93%).

No resultado convencional tinham sido identificados como agentes etiológicos de infecção *Fusarium* sp. na amostra 6 e *T. rubrum* na amostra 8. Com estes dois resultados divergentes, ficámos sem a confirmação molecular do diagnóstico convencional.

Na amostra 22 foi identificado através da sequenciação como agente fúngico causador de doença a *Candida albicans*, resultados que divergem dos resultados obtidos pelos métodos convencionais de diagnóstico. O resultado obtido no diagnóstico convencional foi *T. rubrum*.

Na identificação molecular da amostra 22, em que o fragmento total tinha 518pb, o fragmento estudado tinha 388pb das quais 348pb correspondem ao agente *Candida albicans* com uma percentagem de confiança de 89%. Como existe uma diferença considerável entre o tamanho do fragmento estudado e o tamanho total do fragmento, não podemos afirmar que o agente identificado na sequenciação seja o causador da doença.

## **CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS**

As onicomicoses têm vindo a ganhar uma maior importância nestes últimos anos, deixando rapidamente de ser um simples problema de cosmética. Devido ao elevado risco de um diagnóstico errado se este for apenas baseado na observação clínica das lesões de infecções fúngicas, torna-se fundamental a realização do diagnóstico micológico laboratorial a fim de estabelecer a correcta etiologia da infecção e, conseqüentemente, a terapêutica adequada.

Os fungos que atacam a unha podem ainda veicular a ocorrência de infecções bacterianas secundárias, reacções idiopáticas e urticária crónica. As unhas infectadas podem funcionar como reservatórios de fungos, facilitando a sua transmissão a outras áreas do corpo e inclusive, a outros indivíduos.

Como já foi referido, as onicomicoses podem ser causadas por três tipos de fungos: dermatófitos, leveduras e fungos filamentosos não dermatófitos (FND), existindo porém, diferenças geográficas na epidemiologia e etiologia das onicomicoses, especialmente na frequência em que cada grupo se apresenta como responsável pela infecção (Haneke 1991, Vélez *et al.* 1997).

O diagnóstico das onicomicoses deveria, por rotina, basear-se em vários factores como o historial do doente, o exame físico, a observação microscópica das amostras clínicas e a cultura das mesmas. Há que realçar que existem factores de predisposição como a diabetes, a idade avançada e traumatismos infligidos às unhas que devem ser sempre tomados em consideração.

Alguns dos problemas que afectam as unhas, podem mimetizar infecções fúngicas e estes devem ser identificados correctamente, para uma a prescrição da terapêutica adequada. Entre alguns, podemos

citar a psoríase, infecções bacterianas, dermatites de contacto, onicodistrofias traumáticas, tumores da unha, síndrome da unha amarela e onicolises ideopáticas.

O diagnóstico laboratorial das onicomicoses ainda se baseia, presentemente, em métodos convencionais de exame microscópico directo do material clínico e na cultura, sendo estes os métodos *gold standard* de diagnóstico.

O diagnóstico clínico e laboratorial desta patologia deve ser estabelecido tão precocemente quanto possível, pois é extremamente importante para haja sucesso no tratamento por este ser particularmente não só difícil e dispendioso como principalmente hepatotóxico (Kioshima *et al.* 2002).

Em todos os casos é fundamental a correcta identificação do agente etiológico da infecção, para que seja administrada a terapêutica correcta, uma vez que no caso dos FND a resposta a determinados anti-fúngicos é inexistente ou muito fraca e requer esquemas terapêuticos distintos (Tosti *et al.* 2000, Gupta *et al.* 2001b, Garcia-Effon *et al.* 2004).

Mesmo apesar do um correcto diagnóstico e tratamento, um em cinco doentes com onicomicosose não fica curado utilizando as terapêuticas convencionais. Cerca de 20% das falhas de tratamento, devem-se a um diagnóstico incorrecto, má identificação do agente patogénico, e à presença de uma segunda infecção, assim como às características próprias da unha, à presença de uma elevada concentração do fungo que causa infecção e ou à presença de microrganismos multirresistentes.

A incidência deste tipo de infecção atinge frequentemente valores elevados, mesmo nos países mais desenvolvidos. Estando estimada em cerca de 3% a população atingida por esta infecção, este valor pode crescer de forma significativa até ao 20%, se consideramos certos grupos populacionais tais como trabalhadores rurais, ou mineiros.

Todos os dermatófitos devem ser considerados como tendo um elevado potencial de possível patogenicidade. Durante muito tempo têm sido associados como agentes etiológicos das

onicomicoses ou *Tinea unguium*, algumas espécies de fungos dermatófitos como *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* ou *T. interdigitale* assim como de fungos não dermatófitos.

Nestes últimos anos, o isolamento de fungos dermatófitos a partir destas infecções tem diminuído significativamente, dando lugar ao isolamento, cada vez mais frequente, de outras espécies de fungos anteriormente consideradas contaminantes das culturas. Como forma de confirmação da causa de uma infecção, a identificação definitiva da invasão das unhas por fungos não dermatófitos necessita de isolamento do mesmo agente a partir de mais do que uma amostra da região afectada.

A ocorrência relativamente frequente desses fungos habitualmente saprófitas ambientais nas culturas provenientes de onicomicoses, sem que sejam isolados fungos dermatófitos, leva a suspeitar de uma eventual aquisição de patogenicidade por parte daquelas espécies. A grande dificuldade na identificação e ou classificação dos fungos reside no facto da taxonomia deste grupo envolver classificações baseadas em aspectos morfológicos os quais são aplicados a chaves de identificação (Arx 1974, Barnett & Hunter 1972) embora, em muitos casos, os taxonomistas não sejam consensuais quanto às características que realmente definem uma espécie ou género (Guarro *et al.* 1999). É neste sentido que a identificação molecular das diferentes espécies irá, com certeza, permitir a identificação mais rigorosa devido à sua mais elevada sensibilidade e capacidade discriminatória.

A confirmação microscópica de uma infecção fúngica nas unhas é de grande importância para a prática clínica, pois o tratamento das onicomicoses requer uma terapêutica oral prolongada com fármacos antifúngicos, e o uso prolongado desses fármacos, promove o desenvolvimento de reacções adversas que, no caso da terapêutica oral, têm elevada toxicidade (Savin *et al.* 2007).

O clínico deve estar ciente das limitações da microscopia directa no diagnóstico das causas da onicomicose pois tanto a microscopia directa como a cultura são necessárias para a identificação definitiva dos agentes etiológicos. O diagnóstico laboratorial das infecções causadas por fungos



filamentosos, onde se incluem as dermatofitoses, é baseado na demonstração da presença de hifas e/ou artrosporos nas amostras clínicas no exame microscópico directo, seguido da identificação do fungo crescido em cultura. No caso das leveduras podem-se observar células leveduriformes ou blastósporos, hifas ou pseudofilamentos.

No entanto, o exame directo não permite identificar as espécies fúngicas nem diferenciar as hifas dos dermatófitos dos fungos não dermatófitos, nem estes dos filamentos das leveduras.

Novas metodologias têm vindo a ser desenvolvidas para serem aplicadas na identificação dos agentes causadores de onicomicose a partir do seu DNA contido no material clínico proveniente de lesões. Todavia, até agora, era difícil ter acesso a esse mesmo DNA fúngico.

No nosso entender, o objectivo principal deste trabalho foi atingido na medida em que ficou provado que já é possível extrair DNA fúngico directamente não só de amostras clínicas, como ainda de amostras muito queratinizadas como as unhas. A utilização do sistema QuickGene-Mini80<sup>®</sup> da FUJIFILM em conjunto com um protocolo adequado para extracção de DNA fúngico directamente das amostras de unhas permitiu a sua realização com êxito. A quantificação do DNA existente a partir da extracção directa das amostras foi fundamental para o ajuste da quantidade de DNA a aplicar nas reacções de PCR e, consequentemente, na obtenção dos resultados obtidos.

A utilização dos primers ITS1 e ITS4 permitiu amplificar as regiões ITS1 e ITS2 e o gene 5,8S a partir de DNA total extraído dos isolados fúngicos para além de ter ficado comprovado a especificidade daqueles primers para fungos.

A purificação das amostras utilizando o kit NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II permitiu a purificação directa dos produtos de PCR a partir de bandas excisadas directamente do gel de agarose, passo fundamental para se poder realizar a sequenciação das mesmas e assim avançar no sentido de uma possível identificação das espécies infectantes através da análise das sequências da região ITS do rDNA.

O diagnóstico através das técnicas de biologia molecular (Extracção, Quantificação, P.C.R., Purificação e Sequenciação), uma vez implementado numa rotina laboratorial, revela ser muito mais rápido na identificação dos agentes envolvidos na infecção na medida em que são conseguidos resultados em cerca de 5 dias, no máximo em vez das 3 semanas a um mês do diagnóstico convencional. Além do mais não exigem a necessidade de treino pessoal requerida para a observação de exames directos de amostras infectadas e para a identificação de fungos a partir das culturas, pois estes são os principais factores limitantes do diagnóstico convencional.

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram, em alguns, casos identificar o agente responsável pela onicomycose a partir da análise das sequências da região ITS do rDNA os quais vieram a corroborar com os resultados obtidos pelos métodos convencionais de referência.

No entanto com algumas amostras não foi possível identificar por sequenciação o agente envolvido pois, como tudo indica, é provável que as mesmas tivessem mais do que um fungo e portanto mais do que um fragmento numa mesma amostra, correspondentes aos diferentes agentes etiológicos.

Sugerimos, deste modo, possíveis abordagens futuras para a separação dos diferentes fragmentos de dimensões muito semelhantes por PFGE (*Pulse Field Gel Electrophoresis*), por TGGE (*Temperature Gradient Gel Electrophoresis*) ou ainda por transferência de fragmentos de DNA para membranas de nitrocelulose ou nylon – “Oligonucleotide Array”. Este último método consiste na amplificação por PCR da região ITS utilizando primers universais, seguido da hibridação de produtos PCR marcados com digoxigenina num “array” de oligonucleotidos imobilizado numa membrana. Segundo outros autores este procedimento apresenta uma sensibilidade de 99,5%. Num estudo realizado recentemente este método apresenta-se como uma alternativa de confiança aos métodos de diagnóstico convencional (HSIN *et al.* 2007), para fungos dermatófitos.

Assim, teriam de ser desenhadas sondas de oligonucleótidos específicos para a identificação de diferentes espécies de fungos dermatófitos, fungos não dermatófitos e leveduras. O desenho das sondas pode ser igualmente baseado na sequência das regiões ITS1 e ITS2.

Embora os métodos baseados em técnicas de biologia molecular possam parecer mais onerosos, na realidade, depois de optimizados e integrados numa rotina laboratorial, é bem provável que se revelem mais económicos que os métodos convencionais na medida em que não só cada reagente permite a realização de centenas de análises, como estas, sendo mais rápidas, exigem menos formação técnica para o processamento e menos tempo de ocupação do pessoal técnico. Como são técnicas com uma boa relação entre a qualidade e o preço pensamos que há todo o interesse em desenvolver novos testes moleculares para diagnóstico das infecções fúngicas.

No entanto uma das fortes limitações destas técnicas reside no facto de apesar de ser identificada uma determinada espécie fúngica numa amostra clínica, não implica que esse fungo esteja mesmo a causar a doença. Com fungos, a fronteira entre a colonização e o parasitismo é frequentemente muito ténue pois, entre muitas causas, ocorrer ou não infecção fúngica depende muito do estado imunitário do doente. Daí que se torna necessário saber valorizar se a presença de determinado agente infeccioso está ou não a provocar doença ou, no caso particular deste trabalho, de uma onicomicose.

Será então necessário o estabelecimento de critérios de decisão bem definidos para que estas novas metodologias baseadas em técnicas de biologia molecular passem a ser uma mais-valia.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ARAÚJO, A.J.G., SOUZA, M.A.J., BASTOS, O.M. & OLIVEIRA, J., 2003. Ocorrência de onicomicose em pacientes atendidos em consultórios dermatológicos da cidade do Rio de Janeiro, Brasil. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, **78**(3): 299-308.

ARAÚJO, A.J.G., SOUZA, M.A.J., BASTOS, O.M. & OLIVEIRA, J., 2003. Onicomicoses por fungos emergentes: análise clínica, diagnóstico laboratorial e revisão. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, **78**(4): 445-455.

ARX, J.A., 1974. The Genera of Fungi Sporulating in pure culture. Vaduz: J. Cramer, 351pp.

BADILLET, G., TRAORE, F., BONIATSI, L. & N'DIR, O., 1988. Flore fongique de la pulpe des doigts des ongles des mains chez les teigneux. *Société Française Mycologie Médicale*, **17**(1): 155-158.

BAEK, S.C., CHAE, H. J., HOUH, D., BYUN, D. G. & CHO, B.K., 1998. Detection and differentiation of causative fungi of onychomycosis using PCR amplification and restriction enzyme analysis. *International Journal of Dermatology*, **37**: 682-686.

BARAN, R., BELAICH, S. & BEYLOT, C., 1997. Comparative multicentre double-blind study of terbinafine (250 mg per day) versus griseofulvin (1 g per day) in the treatment of dermatophyte onychomycosis. *Journal of Dermatological Treatment*, **8**(2): 93-97.

BARNETT, H.L. & HUNTER, B.B., 1972. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Burgess Publishing Company, Minneapolis, 241pp.

BASSIRI-JAHROMI, S. & KHAKSARI, A.A., 2009. Epidemiological survey of dermatophytosis in Tehran, Iran, from 2000 to 2005. *Indian Journal Dermatology Venereology Leprology*, **75**:142-7.

BRILHANTE, R.S.N., CORDEIRO, R.A., MEDRANO, D.J.A., ROCHA, M.F.G., MONTEIRO, A.J., CAVALCANTE, C.S.P., MEIRELES, T.E.F. & SIDRIM, J.J.C., 2005. Onychomycosis in Ceará (Northeast Brazil): epidemiological and laboratory aspects. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **100**(2): 131-135.

BURZYKOWSKI, T., MOLENBERGHS, G., ABECK, D., HANAKE, E., HAY, R., KATSAMBAS, A., ROSEEUW, D., KERKHOF, P., AELST, R. & MARYNISSEN, G., 2003. High prevalence of foot diseases in Europe: results of the Achilles Project. *Mycoses*, **46**(11-12): 496-505.

CAMPBELL, I., 1996. Anatomia e fisiologia do aparelho ungueal. *Nailsletter*, **1**(1): 1-3.

CARLILE, M.J. & WATKINSON, S.C., 1994. *The fungi*. Academic, San Diego, 428pp.

DAS, N.K., GHOSH, P., DAS, S., BHATTACHARYA, S., DUTTA, R.N. & SENGUPTA, S.R., 2008. A study on the etiological agent and clinico-mycological correlation of fingernail onychomycosis in eastern India. *Indian Journal of Dermatology*, **53**: 75-9.

DAVEY, K.G., CAMPBELL, C.K. & WARNOCK, D.W., 1996. Mycological techniques. *Journal of Clinical Microbiology*, **49**: 95-9.

- DORDAIN-BIGOT, M.L., BARAN, R. & BAIXENCH, M.T., 1996. Onychomycose à *Fusarium*. *Annales de Dermatologie et de Venereologie*, **123**: 191-193.
- ELEWISKI, B.E., 1998. Onychomycosis: pathogenesis, diagnosis and management. *Clinical Microbiology Reviews*, **11**(3): 415-429.
- ENGLISH, M.P., 1976. Nails and fungi. *British Journal of Dermatology*, **94**: 697-701.
- EVANS, E.G.V., & RICHARDSON, M.D., 1989. Medical mycology: a practical approach. Oxford: IRL Press at Oxford University Press.
- GARCIA-EFFRON, G., GOMEZ-LOPEZ, A., MELLADO, E., MONZON, A., RODRIGUEZ-TUDELA, J.L. & CUENCA-ESTRELLA, M., 2004. *In vitro* activity of terbinafine against medically important non-dermatophyte species of filamentous fungi. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **53**: 1086-1089.
- GARDES, M., WHITE, T.J., FORTIN, J.A., BRUNS, T.D. & Taylor, J.W., 1991. Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. *Canadian Journal of Botany*, **69**: 180-190.
- GAUTRET, P., RODIER, M.H., LACROIX, K.C. & JACQUEMIN, J.L., 2000. Case Report and Review. Onychomycosis due to *C. parapsilosis*. *Mycoses*, **43**: 433-435.
- GHANNOUM, M.A., HAJJEH, R.A., SCHER, R., KONNIKOV, N., GUPTA, A.K. & SUMMERBELL, R., 2000. A large-scale North American study of fungal isolates from nails: the frequency of onychomycosis, fungal distribution, and antifungal susceptibility patterns. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **43**: 641-648.
- GIANDONI, M.B. & GRABSKI, W.J., 1994. Cutaneous candidiasis as a cause of delayed surgical wound healing. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **30**(6): 981-984.
- GIANNI, C., CERRI, A. & CROSTI, C., 2000. Non-dermatophytes onychomycosis. An underestimated entity? A study of 51 cases. *Mycoses*, **43**: 29-33.
- GIRMENIA, C., ARCESE, W., MICOZZI, A., MARTINO, P., BIANCO, P. & MORAGE, G., 1992. Onychomycosis as a possible origin of disseminated *Fusarium solani* infection in a patient with severe aplastic anemia. *Clinical Infectious Diseases*, **14**: 1167.
- GLEN, M., TOMMERUP, I.C., BOUGHER, N.L. & O'BRIEN, P.A., 2001. Specificity, sensitivity and discrimination of primers for PCR-RFLP of larger basidiomycetes and their applicability to identification of ectomycorrhizal fungi in *Eucalyptus* forests and plantations. *Mycological Research*, **150**: 138-149.
- GODOY, P., NUNES, F., SILVA, V., TOMIMORI-YAMASHITA, J., ZAROR, L. & FISCHMAN, O., 2004. Onychomycosis caused by *Fusarium solani* and *Fusarium Oxysporum*. *Mycopathologia*, **157**: 287-290.

- GRASER, Y., EL FARI, M., PRESBER, W., STERRY, W. & TIETZ, H.J., 1998. Identification of common dermatophytes (*Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*) using polymerase chain reactions. *British Journal of Dermatology*, **138**: 576-582.
- GREER, D.L., 1995. Evolving role of non-dermatophytes in onychomycosis. *International Journal of Dermatology*, **34**: 521-524.
- GUARRO, J. & GENÉ, J., 1992. Fusarium infections. Criteria for the identification of the responsible species. *Mycoses*, **35**: 109-114.
- GUARRO, J. & GENÉ, J., 1995. Opportunistic Fusarial infections in humans. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, **14**: 741-754.
- GUPTA, A.K., COOPER, E.A., MACDONALD, P. & SUMMERBELL, R.C., 2001a. Utility of inoculum counting (Walshe and English criteria) in the clinical diagnosis of onychomycosis caused by nondermatophytic filamentous fungi. *Journal of Clinical Microbiology*, **39**: 2115-2121.
- GUPTA, A.K. & HEM, C.J., 2000. Prevalence and epidemiology of onychomycosis in patients visiting physician's offices: a multicenter Canadian survey of 15000 patients. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **43**: 244-248.
- GUPTA, A.K., KOHLI, Y. & SUMMERBELL, R.C., 2000. Molecular differentiation of seven *Malassezia* species. *Journal of Clinical Microbiology*, **38**: 1869-1875.
- GUPTA, A.K. & SUMMERBELL, R.C., 1999. Combined distal and lateral subungueal and white superficial onychomycosis in the toenails. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **41**: 938-944.
- GUPTA, A.K. & LYNDE, C.W., 1997a. Prevalence and epidemiology of unsuspected onychomycosis in patients visiting dermatologists offices in Ontario, Canada-a multicenter survey of 2001 patients, *International Journal of Dermatology*, **36**: 783-787.
- HANEKE, E., 1991. Fungal infections of the nail: nail disease. *Seminars in Dermatology*, **10**: 41-51.
- HILMIOGLU-POLAT, S., METIN, D.Y., INCI, R., DERELI, T., KILINÇ, I. & TUMBAY, E., 2005. Non-dermatophytic molds as agents of onychomycosis in Izmir, Turkey – a prospective study. *Mycopathologia*, **160**: 125-128.
- HOOG, G.S., GUARRO, J., GENÉ, J. & FIGUERAS, M.J., 2000. Atlas of Clinical Fungi. *Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universidad Rovira Virgili*. Reus, Spain.
- HOSSEIN, M., KOICHI, M., MOHAMADREZA, K. & HIDEYO, Y., 2006. A One-Enzyme PCR-RFLP Assay for Identification of Six Medically Important *Candida* Species. *Japanese Journal of Medical Mycology*, **47**: 225-229.
- HSIN, C.L., BOUCHARA, J.P., HSU, M.M.L., BARTON, R. & TSUNG, C.C., 2007. Identification of dermatophytes by an oligonucleotide array. *Journal of Clinical Microbiology*, **45**: 3160-3166.

IWEN, P.C., HINRICHS, S.H. & RUPP, M.E., 2002. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. *Medical Mycology*, **40** (1): 87-109.

JAWETS, E., 1998. *Micologia Médica*. (20 ed), Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 253-270 pp.

KAUR, R., KASHYAP, B. & BHALLA, P., 2008. Onychomycosis - epidemiology, diagnosis and management. *Indian Journal of Medical Microbiology*, **26**: 108-16.

KEDMA, M.L., ROSSANA, S. M.R. & FRANCISCO, M., 2007. Diagnósticos Clínicos e Laboratoriais das Onicomicoses. *NewsLab*, 184-196.

KEMNA, M.E. & ELEWSKI, B.E., 1996. A U.S. epidemiologic survey of superficial fungal diseases. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **35**: 539-542.

KIOSHIMA, E.S., OLIVEIRA, A.C.P. & SVIDZINSKI, T.I.E., 2002. Onicomicoses: do diagnóstico ao tratamento. *Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR*, **6**(2): 159-163.

KOUSSIDOU, T., DEVLIOU-PANAGIOTIDOU, D., KARAKATSANIS, G., MINAS, A., MOURELLOU, O. & SÂMARA, K., 2002. Onychomycosis in Northern Greece during 1994-1998. *Mycoses*, **45**: 29-37.

KURTZMAN, C.P. & FELL, J.W., 1998. Definition, classification and nomenclature of the yeasts. In: *The Yeasts, A Taxonomic Study*, (4th Ed), Elsevier Science B.V., Amsterdam, 3-5pp.

KWON-CHUNG, K.J. & BENNETT, J.E., 1992. *Medical Mycology*, Lea & Febiger, Philadelphia.

LACAZ, C.S., PEREIRA, A.D., HEINS-VACARRI, E.M., CUCÉ, L.C., BENATTI, C., NUNES, R.S., MELO, R.S.T., FREITAS-LEITE, R.S. & HERNANDEZ-ARRIAGADA, G.L., 1999. Onychomycosis caused by *Scytalidium dimidiatum*. Report of two cases. Review of the taxonomy of the synanamorph and anamorph forms of this coelomycete. *Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, **41**(5): 319-323.

LACAZ, C.S., PORTO, C. & MARTINS, J.E.C., 1998. Guia para Identificação Fungos Actinomicetos e Algas, Sarvier, São Paulo.

LACAZ, C.S., PORTO, C., MARTINS, J.E.C., HEIS-VACCARI E.M. & MELO, N.T., 2002. *Tratado de Micologia Médica*, Sarvier, São Paulo.

LACAZ, C.S., PORTO, E. & MARTINS, J.E.C., 1991. Morfologia e biologia dos fungos de interesse médico. *Micologia Médica*, Sarvier, São Paulo, **2**: 31-84.

LALITHA, P., TIWARI, M., PRAJNA, N.V., GILPIN, C., PRAKASH, K. & SRINIVASAN, M., 2007. *Cornea*, **26**: 255-9.

LARONE, D.H., 1987. *Medical important fungi: a guide to identification*, American Society for Microbiology, New York, 230 pp.



- LAWRY, M.A., HANEKE, E., STROBECK, K., MARTIN, S., ZIMMER, B. & ROMANO, P.S., 2000. Methods for diagnosing onychomycosis: a comparative study and review of the literature. *Archives Dermatology*, **136**: 1112.
- LIMA, K.M., RÊGO, R.S.M. & MELO, F.M., 2007. Espécies fúngicas isoladas a partir de unhas de manipuladores de alimentos. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, **39**(3): 193-196.
- LOPES, J.O., ALVES, S.H., MARI, C.R.D., OLIVEIRA, L.T.O., BRUM, L.M., WESTPHALEN, J.B., FURLAN, F.W. & ALTERMANN, M.J.A., 1999. A ten-year survey of onychomycosis in the Central Region of the Rio Grande do Sul, Brazil. *Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, **41**: 147-149.
- LÓPEZ, J.O. & TORRES, R.J.M., 1999a. Especies fungicas poco communes responsables de onicomicosis. *Revista Iberoamericana de Micologia*, **16**(1):11-15.
- LUQUE, A.G., RAMOS, L.L., AMIGOT, S.L. & RICCOMI, A.L., 1997. Estudio micológico de 100 casos de lesiones ungueales de la cidade de Rosario-República Argentina. *Revista Iberoamericana de Micologia*, **14**: 164-167.
- MACHOUART-DUBACH, M., LACROIX, C., DE CHAUVIN, M.F., LE GALL, I., GIUDICELLI, C., LORENZO, F. & DEROUIN, F., 2001. Rapid Discrimination among Dermatophytes, *Scytalidium* spp., and Other Fungi with a PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Ribotyping Method. *Journal of Clinical Microbiology*, **39**: 685-690.
- MADRENYS-BRUNET, J.M., TORRES-RODRIGUEZ, J.M. & URREA-ARBELÁEZ, A., 1996. Estudio epidemiológico de las micosis ungueales en Barcelona. *Revista Iberoamericana de Micología*, **13**: 14-16.
- MAKIMURA, K., TAMURA, Y., MOCHIZUKI, T., HASEGAWA, A., TAJIRI, Y., HANAZAWA, R., UCHIDA, K., SAITO, H. & YAMAGUCHI, H., 1999. Phylogenetic Classification and Species Identification of Dermatophyte Strains Based on DNA Sequences of Nuclear Ribosomal Internal Transcribed Spacer 1 Regions. *Journal of Clinical Microbiology*, **37**: 920-924.
- MARAKI, S. & TSELENTIS, Y., 1998. Dermatophytoses in Crete, Greece, between 1992 and 1996. *Mycoses*, **41**(3-4): 175-178.
- MARTELOZZO, I.C., GUILHERMETTI, E. & SVIDZINSKI, T.I.E., 2005. Ocorrência de onicomicose em Maringá, Estado do Paraná, Brasil. *Acta Scientiarum: Health Science*, **27**: 177-182.
- MARTINS, E.A., GUERRER, L.V., CUNHA, K.C., SOARES, M.M.C.N. & ALMEIDA, M.T.G., 2007. Onicomicose: estudo clínico, epidemiológico e micológico no município de São José do Rio Preto. *Revista Brasileira de Medicina Tropical*, **40**(5): 596-598.
- MATSUMOTO, T., AJELLO, L., MATSUDA, T., SZANISZLO, P.J. & WALSH, T.J., 1994. Developments in hyalohyphomycosis and phaeohyphomycosis. *Journal Medical Veterinary Mycology*, **32**(1): 329-349.

McCULLOUGH, M.J., CLEMONS, K.V., McCUSKER, J.H. & STEVENS, D.A., 1998. Intergenic Transcribed Spacer PCR Ribotyping for Differentiation of *Saccharomyces* Species and Interspecific Hybrids. *Journal of Clinical Microbiology*, **36**(4): 1035-1038.

MENDES-GIANNINI, M.J.S., MARTINS-DINIZ, J.N., SILVA, R.A.M. & MIRANDA, T.E., 2005. Monitoramento de fungos anemófilos e de leveduras em unidade hospitalar. *Revista Saúde Pública*, **39**: 398-405.

MENDES-GIANNINI, M.J.S. & MELHEM, M.S.C., 1996. Infecções Fúngicas *In: Diagnostico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes*, Guanabara Kooga, Rio de Janeiro, 219-294pp.

MERCANTINI, R., MARSELLA, R. & MORRETO, D., 1996. Onychomycosis in Roma, Italy. *Mycopathologia*, **1**: 25-32.

MIDGLEY, G. & MOORE, M.K., 1998. Onychomycosis. *Revista Iberoamericana de Micología*, **15**: 113-117.

MINELLI, L., 1996. Clínica e classificação das onicomicoses. *Nailsletter*, **1**(1):8-9.

MOHAMMAD, M.E.B., HEBA, A., SAMIRA, S., MANAL, B., MONA, E.F. & AKMAL, S.H., 2006. Prevalence of Non-Dermatophyte Molds in Patients with Abnormal Nails. *Egyptian Dermatology Online Journal*, **2**(1): 12.

MONZON DE LA TORRE, A., CUENCA-ESTRELLA, M. & RODRÍGUEZ-TUDELA, L.J., 2003. Estudio epidemiológico sobre las dermatofitosis en España. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, **21**(9): 477-483.

MULLIS, K.B. & FALOONA, F., 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalysed chain reaction. *Methods in Enzymology*, **155**: 335–350.

NUCCI, M., ANAISSIE, E.J., QUEIROZ-TELLES, F., MARTINS, C.A., TRABASSO, P., SOLZA, C., MANGINI, C., SIMÕES, B.P., COLOMBO, A.L., VAZ, J., LEVEY, C.E., COSTA, S., MOREIRA, V.A., OLIVEIRA, J.S., PARAGUAY, N., DUBOC, G., VOLTARELLI, J.C., MAIOLINO, A., PASQUINI, R. & SOUZA, C.A., 2003. Outcome predictors of 84 patients with hematologic malignancies and *Fusarium* infection. *Cancer*, **98**(2): 315-319.

PEREA, S.M.J., RAMOS, M., GARAU, A., GONZALEZ, A.R. & NORIEGA, A., 2000. Prevalence and Risk Factors of *Tinea unguium* and *Tinea pedis* in the General Population in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, **38**: 3226-3230.

PIRACCINI, B.M. & TOSTI, A., 2004. White superficial onychomycosis: epidemiological, clinical, and pathological study of 79 patients. *Archives of dermatology*, **140**(6): 696-701.

PONTES, Z.B., LIMAEDÉ, O., OLIVEIRA, N.M., DOS SANTOS J.P., RAMOS, A.L. & CARVALHO, M.F., 2002. Onychomycosis in João Pessoa city, Brazil. *Revista Argentina de Microbiologia*, **34**: 95-99.

- PRITSCH, K., BOYLE, H., MUNCH, J.C. & BUSCOT, F., 1997. Characterization and identification of black alder ectomycorrhizas by PCR/RFLP analysis of the rDNA internal transcribed spacer (ITS). *New Phytologist*, **137**: 357-369.
- RAMOS E SILVA, M., 2000. *Onicomicoses: diagnóstico diferencial*, Dermatologia atual, Rio de Janeiro. **6**(1): 27-34.
- RAO, S.D., WAVARE, S. & PATIL, S., 2004. Onycholysis caused by *Candida krusei*. *Indian Journal of Medical Microbiology*, **22**(4): 258-259.
- RAZA, A., 1994. Ecology and Epidermology of dermatophytes. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **31**: 521.
- RICHARDSON, M.D. & WARNOCK, D.W., 1993. Fungal infection: diagnosis and management. *Blackwell Scientific Publications*, **1-2**: 192-195.
- RIPPON, J.W., 1988. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. Chromoblastomycosis. 3rd ed. WB Saunders Company. *Medical Mycology*, 276-296pp.
- RUBIO, M.C., REZUSTA, A., TOMÁS, J.G. & RUESCA, R.B., 1999. Perspectiva micológica de los dermatofitos en el ser humano. *Revista Iberoamericana de Micología*, **16**: 16-22.
- SAMPAIO, S.A.P., CASTRO, R.M. & RIVITTI, E.A., 1985. *Dermatologia básica* (3ª edição), Artes Medicas, Rio de Janeiro, 327 pp.
- SAUNTE, D.M.L., HOLGERSEN, J.B., HAEDERSDAL, M., SRAUSS, G., BITSCH, M., SVENDSEN, O.L., ARENDRUP, M.C. & SVEJGAARD, E.L., 2006. Prevalence of Toe Nail Onychomycosis in Diabetic Patients. *Acta Dermato-Venereologica*, **86**: 425-428.
- SCHELL, W.A., 1995. New aspects of emerging fungal pathogens. A multifaceted challenge. *Clinical Laboratory Medicine*. **15**(2): 365-87.
- SIDRIM, J.J.C. & ROCHA, M.F., 2004. *Micologia Médica à luz de autores contemporâneos*, 1ª Ed., Guanabara Koogan.
- SIDRIM, J.J.C. & MOREIRA, J.L.B., 1999. *Fundamentos clínico-laboratoriais da micologia médica*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 171-190 pp.
- SILVA, J.O., CAPUANO, D.M., TAKAYANAGUI, O.M. & GIACOMETTI, JR. E., 2005. Enteroparasitoses e onicomicoses em manipuladores de alimentos do município de Ribeirão Preto, SP, Brasil. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, **8**(4): 385-92.
- SILVA, V., MORENO, G.A., ZAROR, L., DE-OLIVEIRA, E. & FISCHMAN, O., 1997. Isolation of *Malassezia furfur* from patients with onychomycosis. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, **35**(1): 73-74.

- SUMMERBELL, R.C., COOPER, E., BUNN, U., JAMIESON, F. & GUPTA, A.K., 2005. Onychomycosis: a critical study of techniques and criteria for confirming the etiologic significance of nondermatophytes. *Medical Mycology*, **43**: 39-59.
- SZEPIETOWSKI, J.C., REICH, A., GARLOWSKA, E., KULI, M. & BARAN, E., 2006. Factors influencing coexistence of toenail onychomycosis with *tinea pedis* and other dermatomycosis. *Archives of Dermatology*, **142**: 1279-1284.
- THOMAS, V., RUTHERFORD, M.A. & BRIDGE, P.D., 1994. Molecular differentiation of two races of *Fusarium oxysporum* especial form cubense. *Letters in Applied Microbiology*, **18**: 193-196.
- TORRES-RODRIGUEZ, J. M. & LOPEZ-JODRA, O., 2000. Epidemiology of nail infection due to keratinophilic fungi. *Revista Iberoamericana de Micología*, **17**: 122-135.
- TOSTI, A., PIRACCINI, B.M. & LORENZI, S., 2000. Onychomycosis caused by non dermatophytic molds: Clinical features and response to treatment of 59 cases. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **42**: 217-24.
- TRABULSI, L.R., ALTATHUM, F., GOMPERTZ, O.F. & CANDEIAS, J.A.N., 1999. *Microbiologia* (3ª edição). Atheneu. São Paulo. 421-422 pp.
- TSUBOI, R., OGAWA, H. & BRAMONO, K., 1994. Pathogenesis of superficial mycoses. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, **32**: 91-104.
- VANDAMME, P., POT, B., GILLIS, M., DE VOS, P., KERSTERS, K. & SWINGS, J., 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Clinical Microbiology Review*, **60**: 407-438.
- VELEZ, A., LINARES, M.J., FERNÁNDEZ-ROLDÁN, J.C. & CASAL, M., 1997. Study of onychomycosis in Cordoba, Spain: prevailing fungi and pattern of infection. *Mycopathologia*, **137**(1): 1-8.
- WAGNER, D.K. & SOHNLE, P.G., 1995. Cutaneous defenses against dermatophytes and yeast. *Clinical Microbiology Review*, **8**(3): 317-335.
- WEITZMAN, I. & SUMMERBELL, R.C., 1995. The dermatophytes. *Clinical Microbiology Review*, **8**: 240-259.
- WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S. & TAYLOR, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Shinsky JJ, White TJ, editors. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press. San Diego. 315-322 pp.

ANEXOS

Anexo 1

Tabela 5 - Identificação das Amostras Estudadas

Local da colheita	Nº Amostra	Identificação	Local da colheita	Nº Amostra	Identificação
Cova da Moura	837/08	5	Particular	603/97	19
Particular	467/97	10	Particular	603/97	29

Particular	353/99	13 e 57	Particular	120/97	33
Particular	171/00	2	Particular	904/08	48
Particular	387/99	3	Particular	887/08	53
Particular	505/97	4	Particular	905/08	46
Particular	170/00	7	Particular	902/08	41
Particular	270/98	8	Particular	901/08	44
Particular	236/00	12 e 58	Particular	898/08	42
Particular	256/00	16	Particular	900/08	49
Particular	64/00	15	Particular	903/08	54
Particular	270/98	11	Particular	897/08	45
Particular	319/02	14	Particular	41/98	28
Particular	93/98	18	Particular	181/01	26
Particular	106/00	22	Particular	92/99	51
Particular	378/02	20	Egas Moniz, Med II	382/98	21
Particular	21/98	27	Egas Moniz, Med II	359/99	32
Particular	374/99	30	IHMT	40/08	6
Particular	292/98	25	IHMT	404/99	9
Particular	93/98	34	IHMT	1725	17
Particular	292/98	36	IHMT	932/08	23
Particular	606/97	37	IHMT	33/98	24
Particular	114/97	38	IHMT	107/00	40
Particular	90/99	39	IHMT	896/08	56
Particular	49/03	50	IHMT	649/97	52 e 60
Particular	21/98	43 e 59	IHMT	767/07	1
Particular	296/99	55			
Particular	121/97	47			

## Anexo 2

Tabela 6 - Exame Directo, Exame Cultural & Quantificação com Nanodrop

Nº Amost	Identificação	Exame Directo	Exame Cultural	DNA ng/ul	260/280
767/07	1	Negativo	<i>C. parapsilosis</i>	16,41	2,00
171/00	2	Negativo	<i>C. parapsilosis</i>	4,825	3,00
387/99	3	Filamentos Septados	<i>T. rubrum</i>	5,675	2,67

505/97	4	Filamentos Septados	<i>T. rubrum</i>	10,765	1,98
837/08	5	Filamentos Septados	<i>Scopulariopsis</i> sp.	5,815	2,03
40/08	6	Negativo	<i>Fusarium</i> sp.	4,765	1,50
170/00	7	Filamentos Septados	<i>C. guilhiermondii</i> , <i>T. rubrum</i>	4,02	1,80
270/98	8	Artrosporos	<i>T. rubrum</i>	20,06	1,77
236/00	12 e 58	Negativo	<i>Rhodotorula</i> sp.	25,355	1,80
256/00	16	Filamentos Septados	<i>Rhodotorula</i> sp., <i>T. rubrum</i>	18,46	2,38
404/99	9	Filamentos Septados	<i>T. mentagrophytes</i> var <i>interdigitale</i>	20,585	1,83
64/00	15	Filamentos Septados	<i>T. mentagrophytes</i> var <i>interdigitale</i>	9,34	1,78
467/97	10	Negativo	<i>C. parapsilosis</i>	27,62	2,04
270/98	11	Artrosporos	<i>T. rubrum</i>	12,49	1,77
353/99	13 e 57	Células Leveduriformes	<i>C. parapsilosis</i>	6,05	2,10
319/02	14	Filamentos Septados	<i>T. rubrum</i>	22,09	1,97
1725	17	Negativo	Negativo	5,09	1,87
932/08	23	Negativo	Negativo	5,16	2,15
93/98	18	Filamentos Septados e Artrosporos	<i>T. mentagrophytes</i>	10,07	1,90
33/98	24	Leveduras e Filamentos	<i>C. albicans</i>	6,39	1,86
106/00	22	Filamentos Septados	<i>T. rubrum</i>	10,03	1,92
382/98	21	Células Leveduriformes e Filamentos Finos	<i>C. parapsilosis</i>	7,865	1,89
378/02	20	Negativo	<i>C. albicans</i>	7,6	2,26
603/97	19	Negativo	<i>C. parapsilosis</i>	5,18	2,27
359/99	32	Filamentos Septados	<i>T. rubrum</i>	13,58	1,88
181/01	26	Negativo	<i>C. parapsilosis</i>	14,86	2,04
21/98	27	Filamentos Septados	<i>T. rubrum</i>	7,34	1,85
603/97	29	Negativo	<i>C. parapsilosis</i>	16,17	1,98
374/99	30	Filamentos Septados	<i>T. rubrum</i>	6,42	1,73
Nº Amost	Identificação	Exame Directo	Exame Cultural	DNA ng/ul	260/280
292/98	25	Filamentos Septados	<i>C. famata</i>	64,77	1,83
41/98	28	Muitos esporos	<i>C. famata</i>	7,495	1,71
120/97	33	Filamentos Curtos e C. Leveduriformes	<i>T. rubrum</i>	8,27	1,76
93/98	34	Filamentos Septados e Artrosporos	<i>T. mentagrophytes</i>	6,165	1,88
292/98	36	Filamentos Septados	<i>C. famata</i>	5,9	1,90

606/97	37	Filamentos Septados e Artrosporos	<i>C. parapsilosis, T. rubrum</i>	15,685	1,93
114/97	38	Negativo	<i>C. guilhiermondii, Trichosporon sp.</i>	6,98	2,10
107/00	40	Negativo	<i>T. rubrum</i>	6,455	1,71
90/99	39	Filamentos Septados	<i>T. rubrum</i>	15,085	1,77
904/08	48	Negativo	Negativo	5,125	1,66
887/08	53	Negativo	Negativo	4,32	3,54
896/08	56	Filamentos Septados	<i>Scopulariopsis sp.</i>	8,85	1,79
649/97	52 e 60	Muitas Células Leveduriformes	<i>C. intermedia, C. parapsilosis</i>	6,415	1,80
49/03	50	Filamentos Septados	<i>T. rubrum</i>	6,94	1,96
905/08	46	Negativo	Negativo	7,95	1,97
902/08	41	Negativo	Negativo	6,635	2,00
901/08	44	Negativo	Negativo	6,54	1,80
898/08	42	Negativo	Negativo	7,205	2,27
900/08	49	Negativo	Negativo	5,725	1,68
903/08	54	Negativo	Negativo	3,47	2,08
897/08	45	Células Leveduriformes e Filamentos Finos	Negativo	11,235	1,98
21/98	43 e 59	Filamentos Septados	<i>T. rubrum, Cryptococcus unigutulatus</i>	30,04	1,90
296/99	55	Filamentos Septados	<i>T. rubrum</i>	5,88	1,72
92/99	51	Negativo	<i>C. albicans</i>	17,33	1,85
121/97	47	Filamentos Curtos e C. Leveduriformes	<i>T. rubrum</i>	14,02	1,88



## Anexo 3

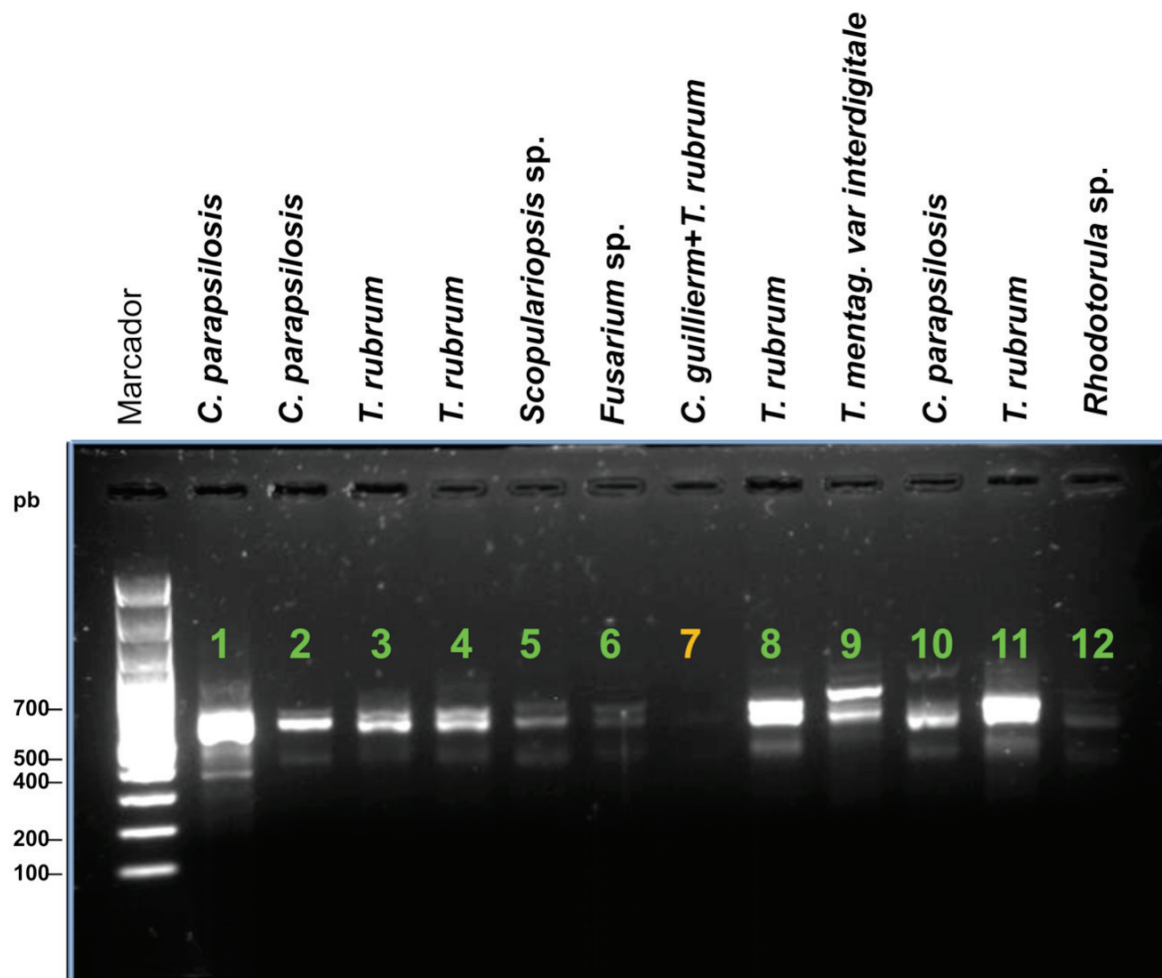


Figura 17 - Amplificação da região ITS do rDNA dos produtos de extracção das amostras 1 a 12, obtidos directamente das unhas infectadas estudadas neste trabalho. As amostras estão identificadas pelos resultados obtidos a partir das culturas do diagnóstico convencional. Os números a verde referem-se às amostras a partir das quais se obteve amplificação da região ITS. A amarelo estão representados os resultados negativos.

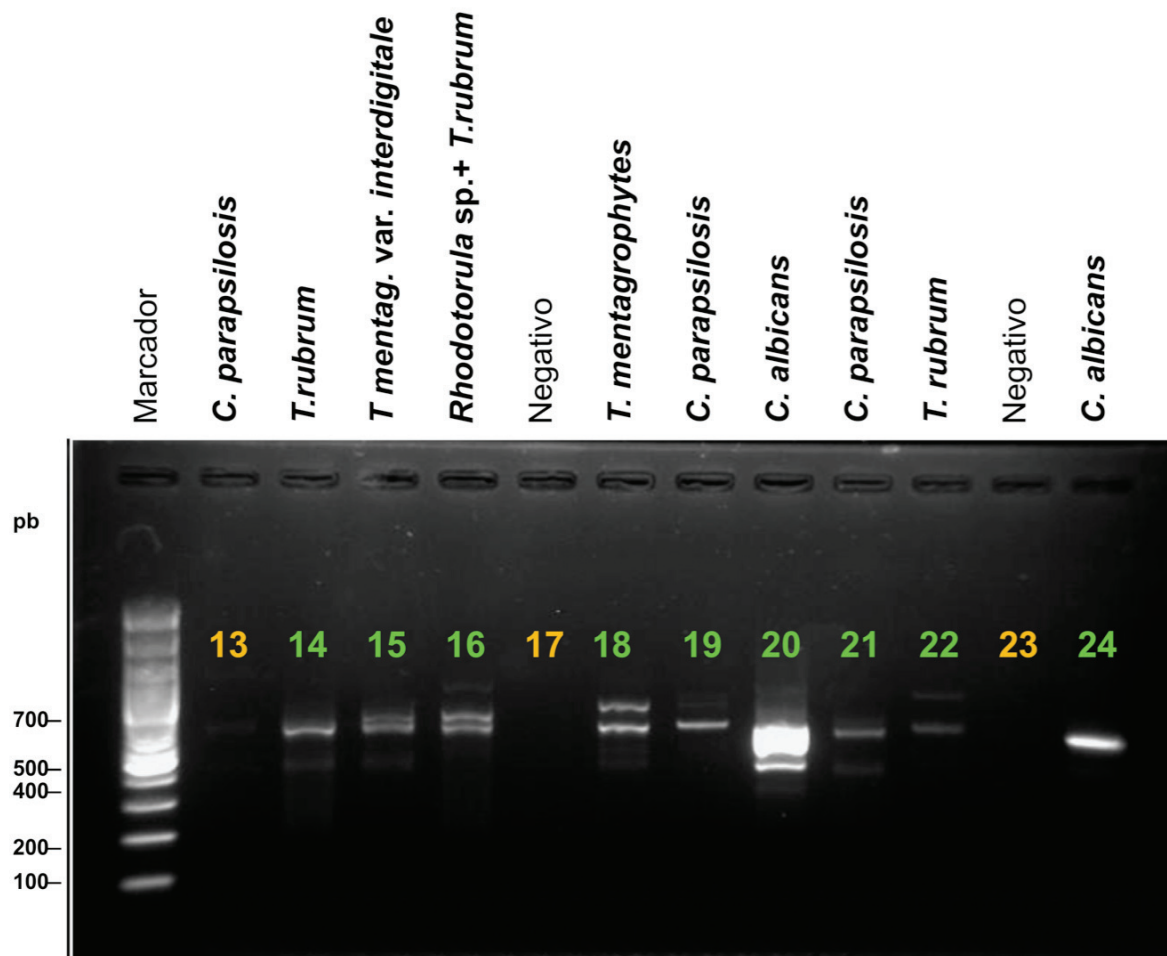


Figura 18 - Amplificação da região ITS do rDNA dos produtos de extracção das amostras 13 a 24, obtidos directamente das unhas infectadas estudadas neste trabalho. As amostras estão identificadas pelos resultados obtidos a partir das culturas do diagnóstico convencional. Os números a verde referem-se às amostras a partir das quais se obteve amplificação da região ITS. A amarelo estão representados os resultados negativos.

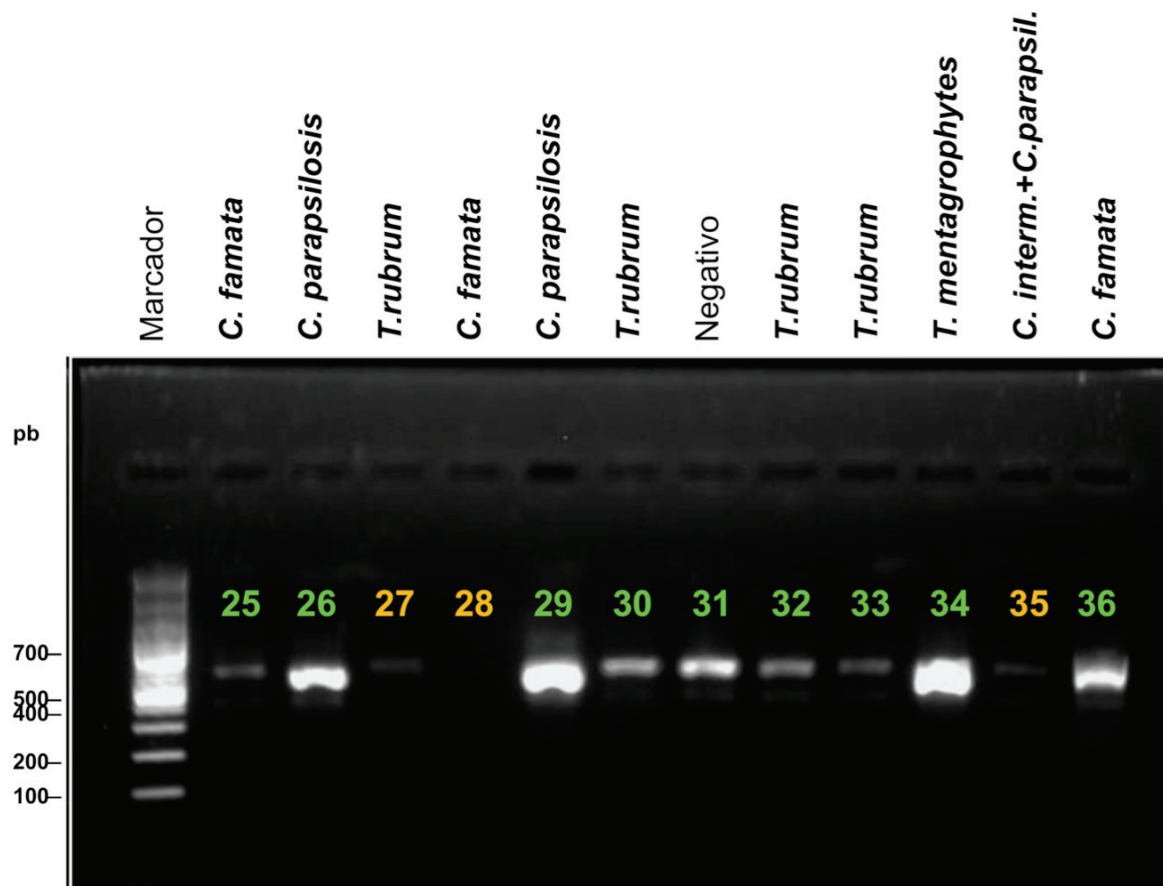


Figura 19 - Amplificação da região ITS do rDNA dos produtos de extracção das amostras 25 a 36, obtidos directamente das unhas infectadas estudadas neste trabalho. As amostras estão identificadas pelos resultados obtidos a partir das culturas do diagnóstico convencional. Os números a verde referem-se às amostras a partir das quais se obteve amplificação da região ITS. A amarelo estão representados os resultados negativos.

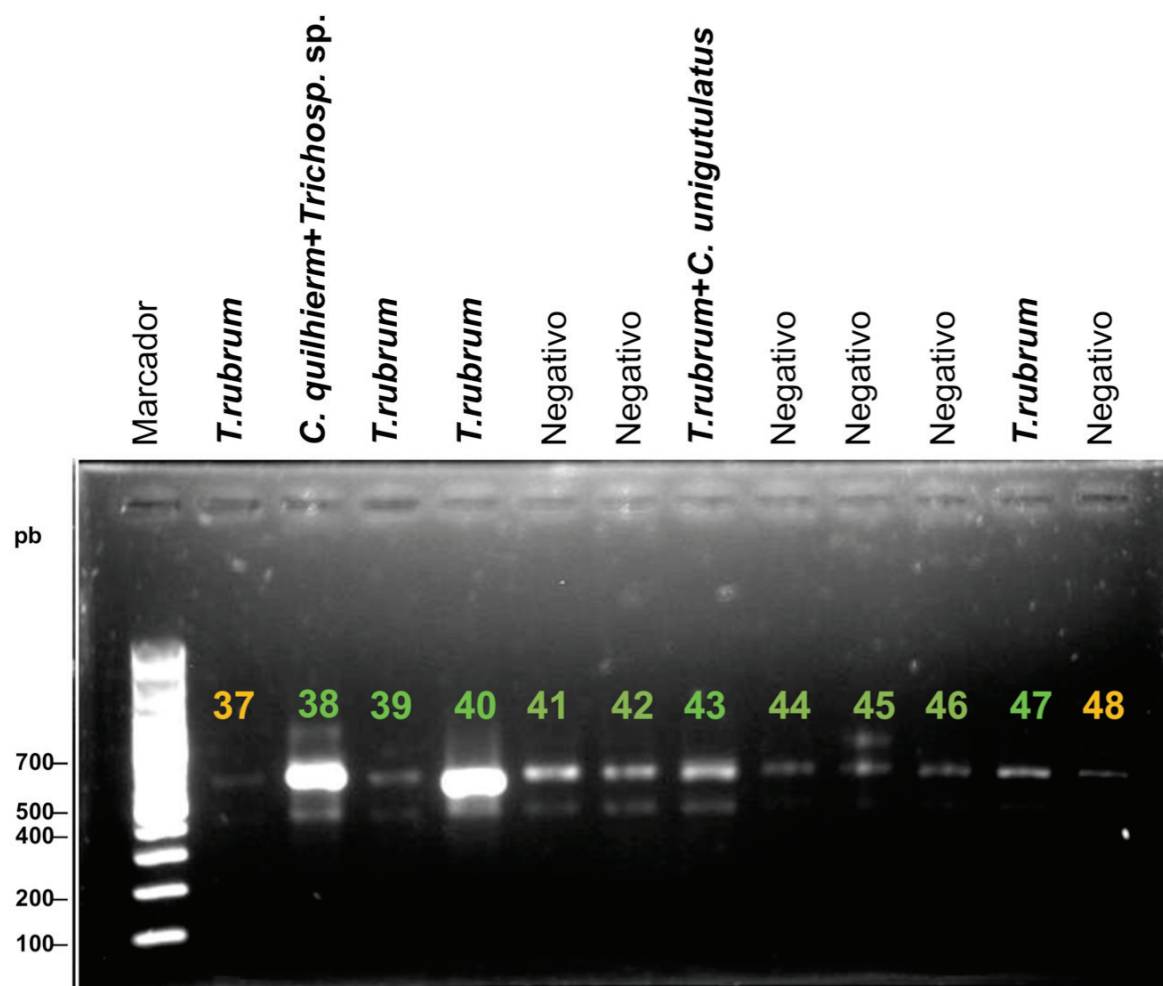


Figura 20 - Amplificação da região ITS do rDNA dos produtos de extracção das amostras 37 a 48, obtidos directamente das unhas infectadas estudadas neste trabalho. As amostras estão identificadas pelos resultados obtidos a partir das culturas do diagnóstico convencional. Os números a verde referem-se às amostras a partir das quais se obteve amplificação da região ITS. A amarelo estão representados os resultados negativos.

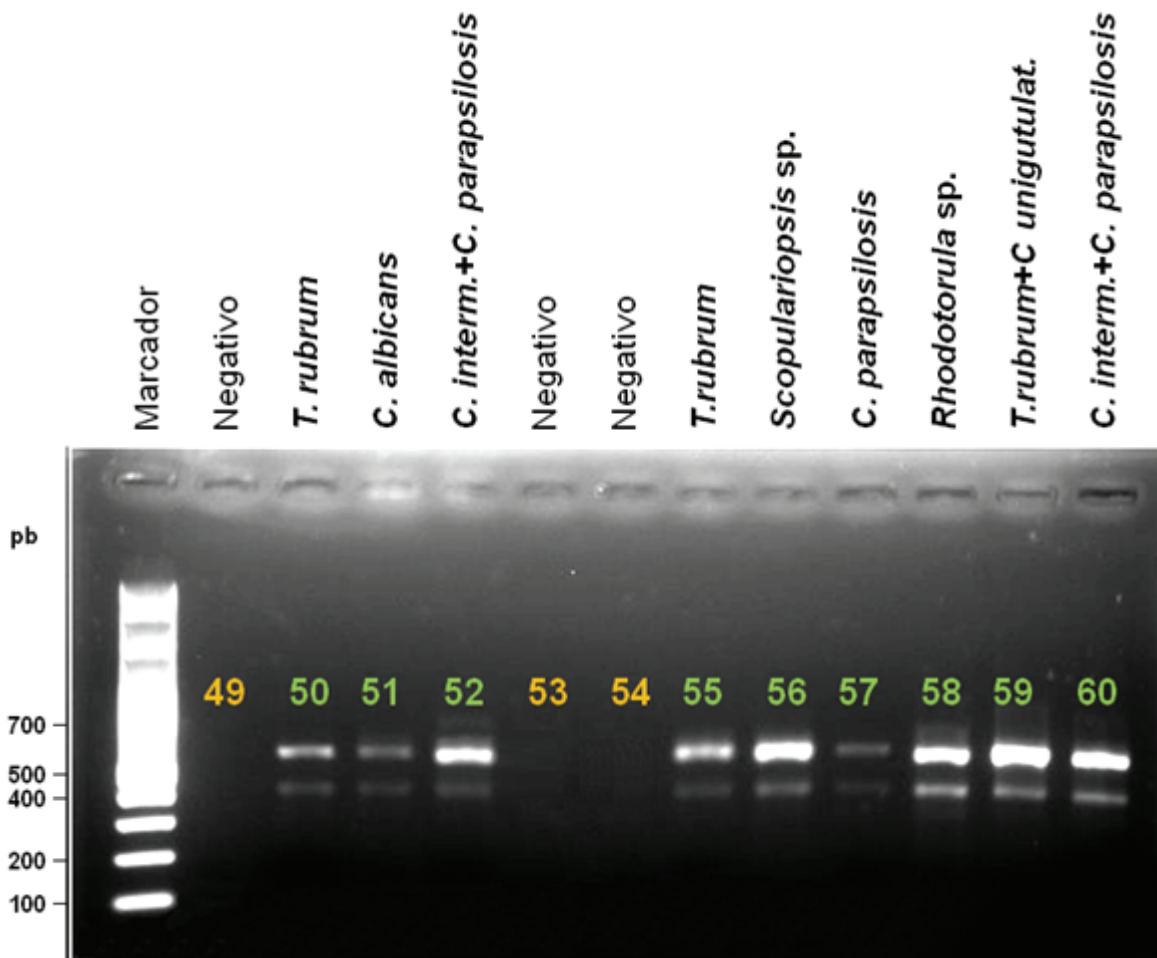


Figura 21 - Amplificação da região ITS do rDNA dos produtos de extracção das amostras 49 a 60, obtidos directamente das unhas infectadas estudadas neste trabalho. As amostras estão identificadas pelos resultados obtidos a partir das culturas do diagnóstico convencional. Os números a verde referem-se às amostras a partir das quais se obteve amplificação da região ITS. A amarelo estão representados os resultados negativos.

## Anexo 4

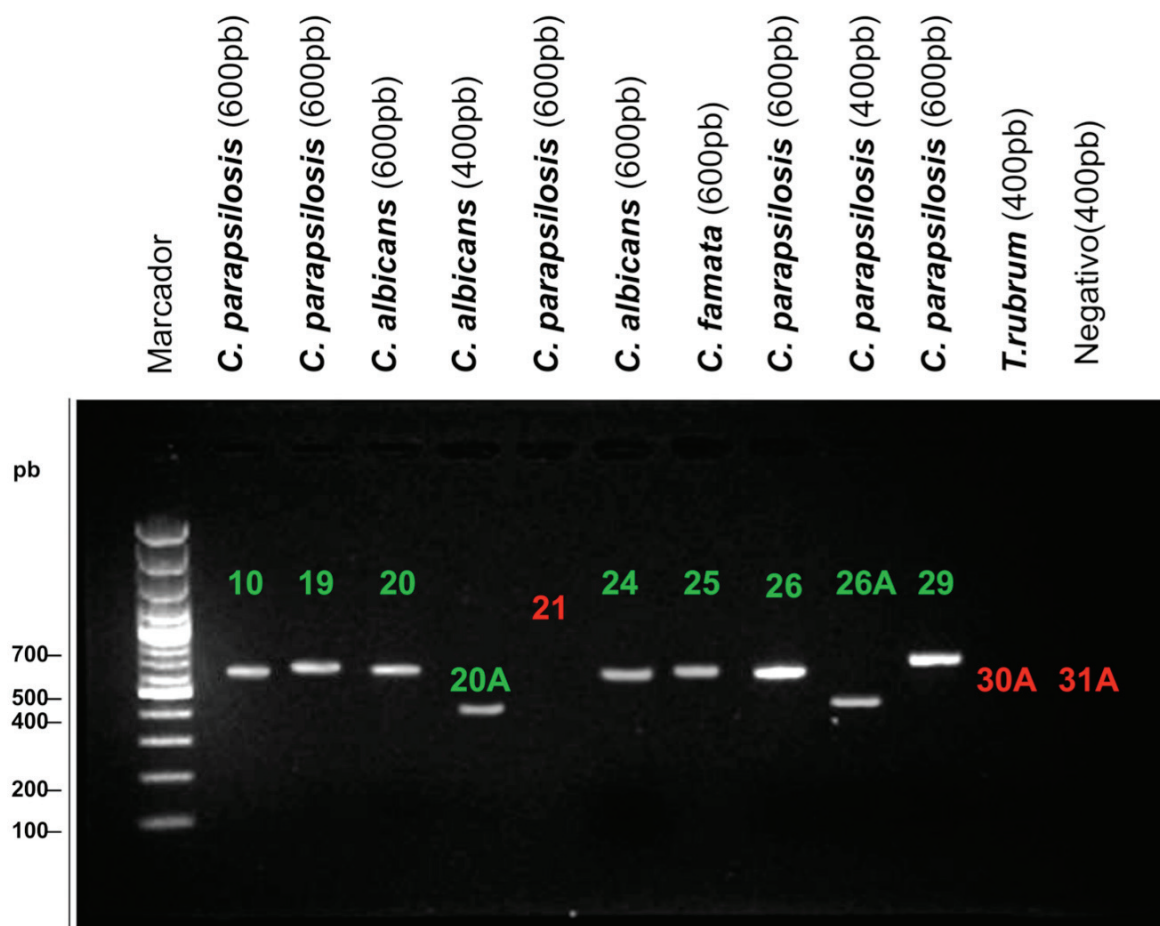


Figura 22 - Fragmentos purificados correspondentes à região ITS do rDNA amplificada por PCR, relativos às amostras 10, 19, 20, 21, 24, 25, 26, 29, 30 e 31. As amostras estão identificadas pelos resultados obtidos a partir das culturas do diagnóstico convencional. Os números a verde referem-se às amostras a partir das quais se obteve produto amplificado da região ITS após a purificação dos produtos de PCR. A vermelho estão representados os resultados para os quais não se obteve fragmentos após a purificação.



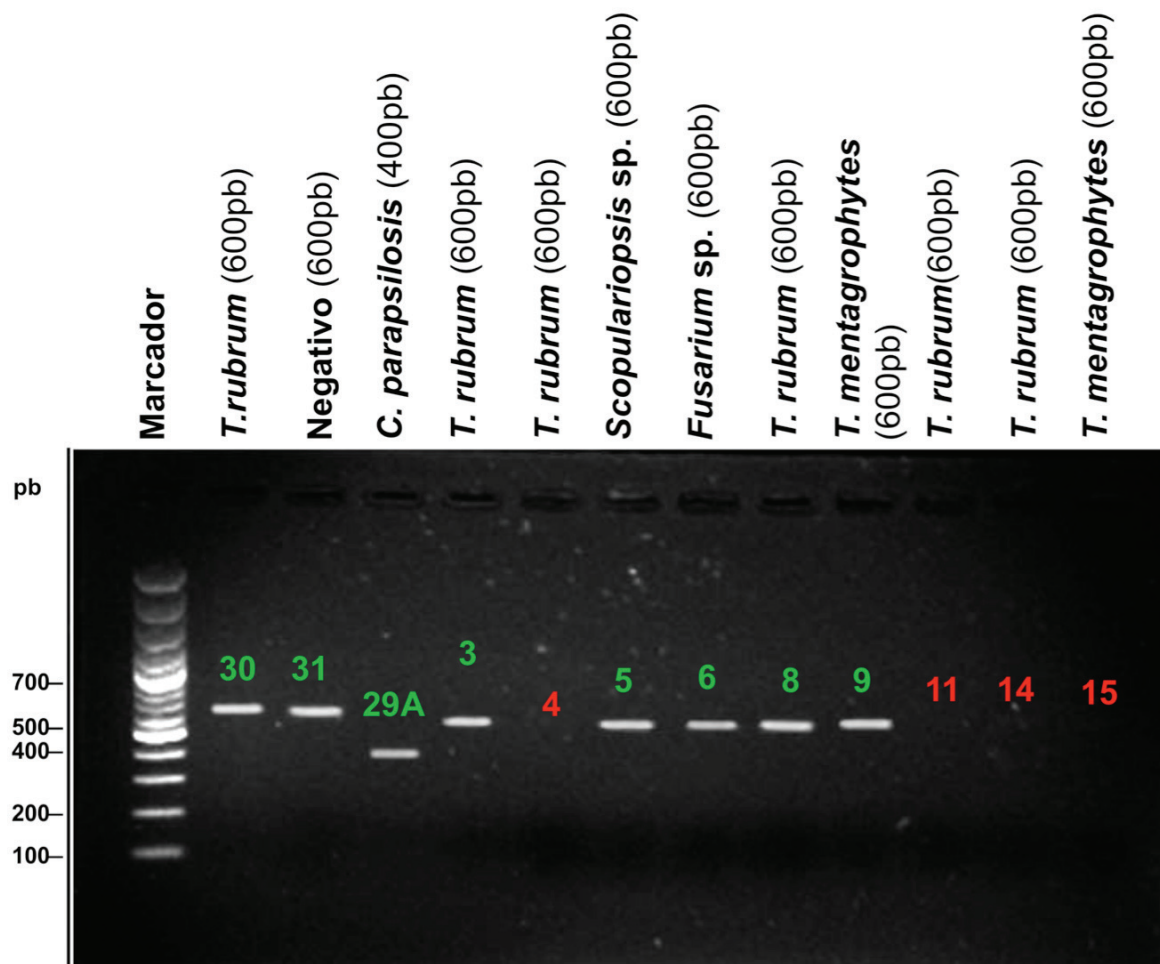


Figura 23 - Fragmentos purificados correspondentes à região ITS do rDNA amplificada por PCR, relativos às amostras 3, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 14, 15, 29, 30 e 31. As amostras estão identificadas pelos resultados obtidos a partir das culturas do diagnóstico convencional. Os números a verde referem-se às amostras a partir das quais se obteve produto amplificado da região ITS após a purificação dos produtos de PCR. A vermelho estão representados os resultados para os quais não se obteve fragmentos após a purificação.

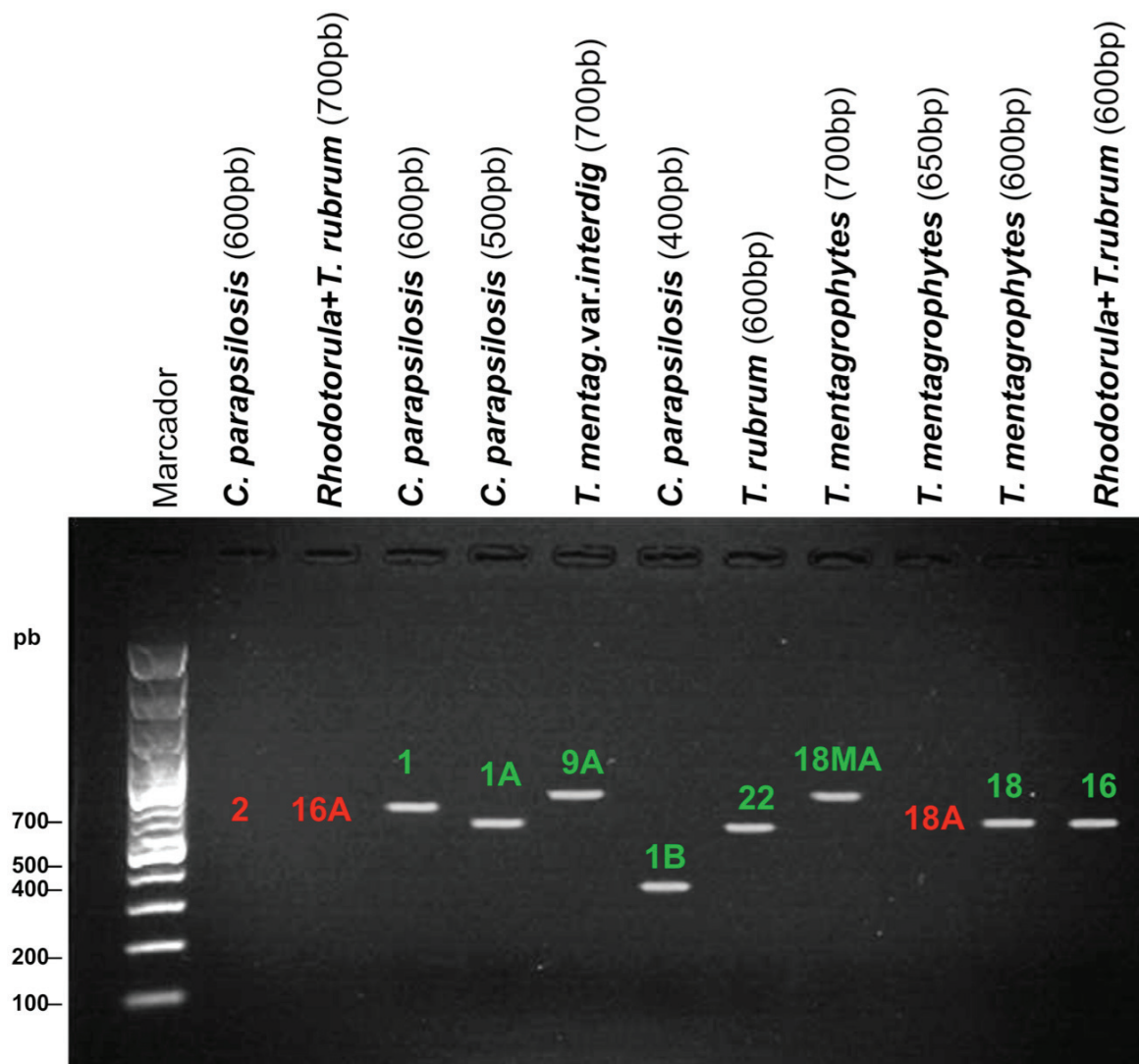


Figura 24 – Fragmentos purificados correspondentes à região ITS do rDNA amplificada por PCR, relativos às amostras 1, 2, 9, 16 e 18. As amostras estão identificadas pelos resultados obtidos a partir das culturas do diagnóstico convencional. Os números a verde referem-se às amostras a partir das quais se obteve produto amplificado da região ITS após a purificação dos produtos de PCR. A vermelho estão representados os resultados para os quais não se obteve fragmentos após a purificação.